



# La liaison réversible NCO appliquée aux domaines de l'inhibition d'enzymes et des oligomères bio-mimétiques

Guillaume Gros

## ► To cite this version:

Guillaume Gros. La liaison réversible NCO appliquée aux domaines de l'inhibition d'enzymes et des oligomères bio-mimétiques. Chimie organique. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. NNT : 2015ENSL0983 . tel-01134777

**HAL Id: tel-01134777**

**<https://theses.hal.science/tel-01134777>**

Submitted on 24 Mar 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° attribué par la bibliothèque : 2015ENSL0983

# THESE

en vue d'obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'Ecole Normale Supérieure de Lyon**

Spécialité : Chimie

Laboratoire de Chimie, UMR 5182

Ecole doctorale de Chimie, ED 206

Présentée et soutenue publiquement le 06/03/2015

par Monsieur Guillaume GROS

---

**Titre :**

**La liaison réversible *NCO* appliquée aux domaines de l'inhibition  
d'enzymes et des oligomères bio-mimétiques**

---

Directeur de thèse : Jens HASSERODT

Après avis de : Monsieur Joseph MORAN  
Monsieur Julien LEGROS

Devant la commission d'examen formée de :

Monsieur Jens HASSERODT, Membre/Directeur  
Monsieur Joseph MORAN, Membre/Rapporteur  
Monsieur Julien LEGROS, Membre/Rapporteur  
Monsieur Franck DENAT, Membre  
Monsieur Julien LECLAIRE, Membre



*La chance sourit aux audacieux.*

« *Fortes fortuna juvat.* » Virgile

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma très grande reconnaissance à Jens Hasserodt, mon directeur de thèse, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées tout au long de ces quatre années. Durant toute cette aventure, qui a commencé par mon stage de M2, il a su me guider, m'orienter, me conseiller tout en me laissant une très grande autonomie, ce qui m'a permis de m'investir et de m'épanouir dans ma recherche. Je n'oublierai jamais les longues discussions d'égal à égal que nous avons eues, d'avoir cru et de m'avoir poussé à poursuivre mes idées et initiatives.

Je tiens ensuite à remercier très chaleureusement Dr. Moran et Dr. Legros, mes rapporteurs, pour avoir accepté la lourde tâche de juger et relire chaque ligne de ce manuscrit. Merci également aux Pr. Denat et Pr. Leclaire d'avoir répondu favorablement à notre invitation pour examiner mon travail et faire partie de mon jury.

J'aimerais ensuite remercier tous les membres passés et présents de l'équipe de Chimie Bio-Organique et plus particulièrement Maxime pour sa gentillesse, ses conseils, sa bonne humeur et sa drum'n'bass ; Jacek, notre petit Polak, pour son énorme cœur, sa générosité sans borne, sa vodka et les soirées Colons de Catane ; Fayçal, pour les discussions scientifiques et personnelles de haut vol, Oliver pour ses jeux de société et sa Vegemite ; Anna et Monica pour leur gentillesse et l'atmosphère hispanique qu'elles ont fait régner dans le bureau ; Jinping pour ses petites attentions et les quelques mots de chinois qu'on a pu échanger ; Pauline pour sa bonne humeur et ses talents de bricoleuse ; et Corentin pour nos discussions scientifiques et son amitié. Je tiens également à remercier mes deux stagiaires canadiennes Paula et Emma qui m'ont aidé sur une partie de cette thèse.

Je suis reconnaissant à tous les membres du Laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon, dont sa directrice Chantal Andraud, sans qui ces quatre années n'auraient pas été aussi agréables. Je souhaiterais tout d'abord remercier mon coloc' et ami Martin pour ces six années passées ensemble, nos discussions sportives, son soutien face aux joueuses qui trichent, sa bonne humeur, son pays basque ; Philippe, mon encadrant de stage de M2, pour son aide, son amitié marseillaise, et toutes les discussions qu'on a pu avoir ; Laure-Lise, pour ses talents de pâtissière, sa bonne humeur permanente, nos interminables discussions ; Benjamin, pour ses macarons, sa bonne humeur et sa musique dans le labo ; Aline, pour son amitié et toutes nos pauses ; Christophe K., pour ses organisations de sorties Ninkasi ; Sandrine, pour toutes les discussions et les expériences exotiques qu'on a pu mettre en place en RMN ; Delphine et Jean-Christophe, pour leur gentillesse et leurs conseils ; Kevin, Anne-Gaëlle et Marie-Françoise, sans qui le laboratoire n'aurait pas aussi bien tourné ; Christian, pour nos discussions et son aide pour le site-web ; Laure, pour sa patience et son courage de s'occuper du LCMS ; Maëlle, ma dernière co-bureau, pour sa gentillesse ; et tous les autres que j'espère ne pas vexer pas en ne les

citant pas ici – mais la liste commence à être longue – pour leur bonne humeur qui a fait que je n’oublierai jamais les bons moments passés ici.

J’aimerais également remercier Lorena Martinez et le Dr. Pierre Falson d’avoir accepté de collaborer avec nous et permis de tester nos candidats à l’inhibition de la protéase du VIH-1 sur un nouveau système *in cellulo*. Merci surtout à toi, Lorena, qui as effectué une montagne de travail en un temps tout simplement record. J’aimerais aussi remercier le Pr. Franck Denat, sans qui je n’aurais jamais eu l’idée de développer mon troisième projet et d’avoir accepté avec Frédéric Boschetti de nous rencontrer. J’espère que la collaboration que nous sommes en train d’initier portera ses fruits.

Merci au Service juridique de l’ENS, et plus particulièrement à Justine, pour leurs conseils lors du dépôt du brevet. Et surtout à Christian Chapelle, notre responsable valorisation, qui nous a accompagnés tout au long de cette longue procédure et donné de très précieux conseils lorsque je cherchais à bâtir mon futur projet professionnel.

Je voudrais ensuite adresser un énorme Merci à tous mes amis, à Lyon, à Paris, à Singapour ou ailleurs qui ont de loin assisté à cette folie et qui m’ont encouragé à leur manière. Merci notamment à mes colocs Antoine, Camille, Pauline et Martin avec qui je garderai des souvenirs inoubliables, mes amis de l’ENS, mes amis de Ginette, mes amis singapouriens.

Je tiens évidemment à remercier ma famille pour leur immense soutien. Merci à vous qui avez pris le temps de relire tout ou en partie ce manuscrit pour corriger mon pauvre français. Merci à tous pour votre patience, vos encouragements, vos efforts pour essayer de comprendre ce que j’ai fait pendant quasiment quatre ans. Merci également de m’avoir aidé à réfléchir à ma reconversion et de m’avoir poussé et soutenu dans mes choix.

Et enfin je voudrais te remercier, Anne-Laure, pour ta présence à mes côtés et ton soutien sans faille tout au long de cette thèse. Merci pour avoir su, malgré la distance, me pousser à finir ce manuscrit et pour m’avoir aidé dans les moments difficiles. Merci de m’avoir écouté lorsque je t’exposais mes idées auxquelles tu ne comprenais rien! Cette thèse se finit en partie grâce à toi.

### **Détails pratiques**

Ces travaux de thèse (01/09/2011 – 06/03/2015) se sont déroulés sous la direction du Professeur Jens Hasseroth, au sein de l'équipe de Chimie Bio-Organique, dans le Laboratoire de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit relèvent de mon travail personnel, sauf mention explicite du contraire. Les résultats rapportés dans le chapitre 4 ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec Lorena Martinez sous la direction du Docteur Pierre Falson, au sein de l'équipe Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Médicaments, à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7 Passage du Vercors, 69007 Lyon, France. Certaines des synthèses rapportées ont également été réalisées par les deux stagiaires encadrées lors de cette thèse : Paula Adler (05/2012 – 07/2012) et Emma Fowler (09/2012 – 12/2013) toutes deux de l'Université d'Ottawa, Canada. Ces travaux sont répertoriés dans les cahiers de laboratoire n° E32354, E32314, E44675, E002584, E75373, E44678, et E003471.

Ces travaux de thèse ont été financés par une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
1. Design d'inhibiteurs de la protéase VIH-1 .....	1
2. Conception d'un nouvel oligomère .....	2
<b>Chapitre 1. L'interaction amine tertiaire – carbonyle (ou <i>NCO</i>).....</b>	<b>5</b>
1. Premières observations.....	5
1.1. Réactivité.....	7
1.2. Influence de la pré-organisation et des substituants .....	8
2. Analyses spectroscopiques .....	10
2.1. IR.....	10
2.2. RMN.....	11
3. Effet du solvant et équilibre conformationnel .....	12
4. Application : Angle de Bürgi-Dunitz .....	13
<b>Partie I : La liaison réversible <i>NCO</i> appliquée au domaine de l'inhibition d'enzymes .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 2. La protéase VIH-1 : une cible de choix .....</b>	<b>19</b>
1. Protéases.....	19
2. Protéases aspartiques .....	20
3. Protéase VIH-1 .....	23
4. Inhibiteurs de protéases aspartiques .....	24
5. Inhibiteurs présentant un motif <i>NCO</i> .....	27
<b>Chapitre 3. Développement d'une synthèse modulaire : vers une bibliothèque d'inhibiteurs.....</b>	<b>31</b>
1. Objectif du projet.....	31
2. Résultats de synthèse.....	33
2.1. Modifications apportées à la synthèse de Waibel.....	33
2.2. Modification de la partie acide aminé .....	34
2.3. Modification de l'hydrazine .....	37



2.4. Tétrastitution de l'urée et introduction de substituants .....	39
2.5. Tentatives d'obtention d'hydroxy-cétones .....	44
2.6. Synthèse d' $\alpha$ -méthyle acide aminés .....	47
3. Conclusion et perspectives .....	49
<b>Chapitre 4. Mesures biologiques .....</b>	<b>51</b>
1. Inhibition vis-à-vis de la protéase VIH-1 .....	52
1.1. Tests <i>in cellulo</i> .....	52
1.2. Tests FRET .....	54
2. Les transporteurs membranaires, responsables malgré eux de résistances aux médicaments... 57	
2.1. Tests de transport .....	57
2.2. Inhibition des pompes de transports .....	59
3. Conclusion et perspectives .....	60
<b>Partie II : Conception d'un nouvel oligomère bio-mimétique basée sur la liaison réversible NCO .....</b>	<b>61</b>
<b>Chapitre 5. Les foldamères : vers des structures secondaires prédéfinies .....</b>	<b>63</b>
1. Notion de repliement et moyens de caractérisation .....	65
1.1. Réaction de repliement .....	65
1.2. Moyens de caractérisation .....	67
2. Aperçu des différents types de foldamères et de leurs applications potentielles .....	70
2.1. Différents types de structures .....	70
2.2. Vers des séquences hétérogènes .....	71
2.3. Applications .....	71
3. Vers des foldamères hydrosolubles .....	72
3.1. Formation d'un macrocycle .....	72
3.2. Rigidification de la chaîne oligomérique .....	73
3.3. Utilisation d'une interaction favorisée en milieu aqueux : la liaison NCO .....	73
<b>Chapitre 6. Conception et synthèse d'un nouveau foldamère .....</b>	<b>77</b>
1. Objectif du projet : nouvelle stratégie .....	77
2. Analyse rétrosynthétique .....	79

3. Synthèse des différents monomères .....	81
3.1. Synthèse à partir de la 5-chloro-2-pentanone .....	81
3.2. Synthèse à partir de l'acide lévulinique.....	81
3.3. Synthèse inspirée de celle de l'acide $\delta$ -aminolévulinique .....	82
3.4. Synthèse à partir du chlorure de 4-chlorobutyryle .....	83
3.5. Synthèse à partir de la $\beta$ -valérolactone.....	84
3.6. Synthèse à partir de l'oxopimelate d'éthyle .....	86
4. Test de couplage.....	88
4.1. A partir du monomère A.....	89
4.2. A partir du monomère B.....	90
4.3. A partir du monomère C.....	91
5. Test de déprotection .....	93
6. Conclusion et perspectives : vers la synthèse sur support solide .....	95
<b>Partie III : Développement d'un procédé de synthèse .....</b>	<b>97</b>
<b>Chapitre 7. Une petite histoire autour de la synthèse et de la dérivatisation du 1,4,9-triazacyclononane (TACN) .....</b>	<b>99</b>
1. Préparation de la plateforme TACN.....	100
2. <i>N</i> -alkylations .....	102
2.1. Contrôle de l'alkylation.....	102
2.2. Par formation d'un intermédiaire orthoamide .....	103
2.3. Par formation d'un intermédiaire amina.....	104
2.4. Par mono ou diprotection .....	104
3. <i>C</i> -alkylations .....	105
3.1. Par la synthèse de Richman et Atkins .....	105
3.2. Par alkylation d'un sel d'imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyrazin-4-ium .....	106
<b>Chapitre 8. Mise au point d'un accès direct à des TACNs présentant une substitution 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub> .....</b>	<b>109</b>
1. Etude théorique du bicyclic et analyse rétrosynthétique .....	110
2. Par formation du bicyclic nu .....	112
3. Par formation directe du bicyclic bi-substitué.....	113

4. Clivage des groupements PMB pour la synthèse de DPTACN.....	115
5. Conclusion et perspectives .....	117
5.1. Vers des dérivés du NOTA/NODAGA .....	118
5.2. En partant d'autres polyéthylènepolyamines.....	120
5.3. Autres perspectives.....	121
<b>Partie expérimentale – Experimental part.....</b>	<b>123</b>
Chemistry .....	123
Procedures for Part I.....	123
Procedures for Part II .....	141
Procedures for Part III .....	155
Biological Methods .....	161
1. Test FRET : .....	161
2. ABC pumps transport inhibition .....	162
<b>Annexes .....</b>	<b>164</b>
Cytométrie de Flux.....	164
Etude d'impuretés et d'intermédiaires réactionnels .....	166
<b>Bibliographie.....</b>	<b>164</b>
<b>Publications.....</b>	<b>175</b>



## Résumé

Cette thèse décrit le développement d'une gamme d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 et d'un oligomère bio-mimétique comportant en leur sein une ou plusieurs interactions réversibles entre une amine tertiaire et un carbonyle, appelée interaction NCO. Cette interaction est favorisée en milieu fortement protique polaire comme les milieux aqueux.

Ces travaux ont permis de mettre au point une synthèse modulaire qui a donné lieu à l'obtention de 7 nouveaux candidats à l'inhibition de la protéase du VIH-1. Les modifications de synthèse ont notamment permis de travailler à de plus grandes échelles et d'apporter une grande versatilité à cette synthèse. Les candidats obtenus ont alors été testés *in vitro* et *in cellulo* avec une nouvelle méthode en collaboration avec Lorena Martinez et Pierre Falson, de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP).

Dans un deuxième temps, nous avons élaboré une nouvelle stratégie de synthèse d'un oligomère bio-mimétique. Plusieurs monomères et voies de synthèse ont été explorés et un tétramère a pu être isolé. Malheureusement, certains obstacles, notamment issus de la purification, ont limités les quantités obtenues ce qui n'a pas permis de pousser l'étude comportementale de ces oligomères. Les travaux présentés ici sont ceux de l'optimisation de la synthèse et des perspectives concernant ce sujet.

Enfin ce manuscrit détaille le développement d'un nouveau procédé de synthèse permettant l'obtention de dérivés du 1,4,7-triazacyclononane présentant un motif de N-substitutions 2Ra/Rb, travail ayant abouti au dépôt d'un brevet.

### Mot-clefs

Interaction amine tertiaire – carbonyle (*NCO*)

Inhibiteur enzymatique

VIH

Amination réductrice

Foldamère / Oligomère

Triazacyclononane

## Abstract

This thesis relates the research performed on the design and synthesis of a new type of HIV-1 protease inhibitors and a new archetype of a bio-mimetic foldamer based on an unusual interaction, the NCO interaction. This interaction occurs between a tertiary amine and a carbonyl group in highly polar and protic media, such as aqueous media.

The first half of my work focused on the development of a modular synthesis towards candidates for the inhibition of HIV-1 protease. This research enabled us to work on large scale and to be able to modify at will most of the candidates' functions. Seven new inhibitors were isolated and tested *in vitro* and *in cellulo* with an original method, in collaboration with Lorena Martinez and Pierre Falson, from the Institute of Biology and Chemistry of Proteins (IBCP).

The second half of my work was dedicated to the design of a new backbone for a bio-mimetic oligomer. A few strategies were explored and a monomer was chosen to be oligomerized. The coupling enabled the isolation of a tetramer. Unfortunately, serious purification issues limited the quantity of the previous tetramer and no foldamer study could be performed. The work presented here are the synthesis' optimization and the perspectives to overcome the purification issues.

In addition, a new process for the synthesis 1,4,7-triazacyclononanes displaying a 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub> N-substitution pattern was developed from diethylenetriamine in only four steps. This work was patented during this PhD.

### Keywords

Tertiary amine – carbonyl (NCO) interaction

Enzymatic inhibitor

HIV

Reductive amination

Foldamer / Oligomer

Triazacyclononane

## Liste des abréviations

Ac	Acétyl	DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique	DCM	DiChloroMéthane
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	DETA	DiEthylèneTriAmine
Ala	Alanine	DIBAL-H	Hydruure de DiIsoButylAluminium
APTS	Acide ParaToluèneSulfonique	DMF	DiMéthylFormamide
Arg	Arginine	DMP	Dess Martin Periodinane
ARN	Acide RiboNucléique	Doxy	Doxycycline
Asn	Asparagine	DPTACN	1,4-DiPicolyl-1,4,7-TriAzaCycloNonane
Asp	Acide Aspartique	EDANS	Acide 5-(2-amino-éthylamino)-naphthalène-1-sulfonique
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)</i>	Et <sub>3</sub> N	Triéthylamine
Bn	Benzyl	EtOAc	Acétate d'éthyle
Boc	<i>Tert</i> -butoxycarbonyle	EtOH	Ethanol
Bu	Butyl	Fmoc	FluorenylMéthylOxyCarbonyl
Bz	Benzoyl	FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
Cbz	Carboxybenzyle	GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i> : Dichroïsme Circulaire	Gln	Glutamine
CDI	CarbonylDiImidazole	Glu	Acide Glutamique
CDT	CarbonylDiTriazole	Gly	Glycine
CEST	<i>Chemical Exchange Saturation Transfer</i>	HAART	<i>Highly Active AntiRetroviral Therapy</i>
COSY	<i>CO</i> rrélation <i>Sp</i> ectroscopY	HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
Cys	Cystéine	HMDS	HéxaMéthylDiSiloxane
DABCYL	Acide 4-(diméthylaminoazo)benzène-4-carboxylique	HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>

IBX	Acide 2-iodobenzoïque	Phe	Phénylalanine
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane	Pht	Phthaloyle
Ile	Isoleucine	PMB	<i>para</i> -MéthoxyBenzyle
INT	Etat Intermédiaire	PR	Protéase
IR	InfraRouge	Pro	Proline
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	p-TsOH	Voir APTS
K <sub>i</sub>	Constante d’Inhibition	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Leu	Leucine	RX	Rayons X
Lys	Lysine	Ser	Sérine
Me	Méthyle	SIDA	Syndrome d’ImmunoDéficiency Acquis
MeCN	Acétonitrile	SN	Substitution Nucléophile
MeI	Iodure de Méthyle	TACN	1,4,7-TriAzaCycloNonane
MeOH	Méthanol	TBAB	Bromure de Tétrahydro- <i>n</i> -ButylAmmonium
Met	Méthionine	TBAF	Fluorure de Tétrahydro- <i>n</i> -ButylAmmonium
Moz	<i>para</i> -méthoxybenzyloxycarbonyle	TBS	Tert-ButyleDiMéthyleSilyle (TBDMS)
MW	<i>MicroWave</i> : micro-onde	tBu	<i>tert</i> -butyle
NBS	<i>N</i> -BromoSuccinimide	Thr	Thréonine
NCO	Liaison ou Interaction Amine tertiaire - Carbonyle	TIBA	TriIsoButylAluminium
NOE	Effet Overhauser Nucléaire	TMS	TriMéthyleSilyle
PET	Tomographie par Emission de Positons	TMSCl	Chlorure de TriMéthyleSilyle
Pi	Picolyle	TMSI	Iodure de TriMéthyleSilyle
Pg	<i>Protective group</i> : groupement protecteur	THF	TétrahydroFurane
P-gp	P-glycoprotéine	TLC	<i>Thin Layer Chromatographie</i> : Chromatographie sur Couche Mince (CCM)
Ph	Phényle	Tf	Triflate



Trp	Tryptophane	UV	UltraViolet
Ts	Tosyle	Val	Valine
TS	<i>Transition State</i> : état de transition	VIH	Virus d'Immunodéficience Humaine
Tyr	Tyrosine		





## Introduction

### 1. Design d'inhibiteurs de la protéase VIH-1

Dans les années 1980, les patients chez lesquels avait été diagnostiqué le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) pouvaient espérer vivre quelques mois de plus à l'aide d'un traitement coûteux et peu adapté. Avec les progrès rapides de la chimie médicinale et la multiplication des médicaments ciblant le virus d'immunodéficience humaine (VIH), la multi-thérapie, HAART (pour « highly active antiretroviral therapy »), fut proposée en 1996, lors de la 11<sup>ème</sup> Conférence internationale sur le SIDA. L'avènement d'une telle thérapie signa la fin de l'arrêt de mort pour les individus chez qui le SIDA était diagnostiqué. En effet, l'espérance de vie d'un individu de 20 ans séropositif ayant accès à des soins est actuellement de l'ordre de 71 ans.<sup>1</sup>

Le VIH est un rétrovirus qui s'attaque aux cellules du système immunitaire en s'attachant puis en fusionnant avec ces dernières. Une fois à l'intérieur de la cellule, la capside se désagrége pour libérer les deux brins d'ARN et les enzymes qu'elle contenait. La transcription de l'ARN en ADN peut alors s'effectuer à l'aide d'une enzyme spécifique, la transcriptase inverse. Une fois l'ADN produit, il pénètre dans le noyau et s'intègre dans le génome humain grâce à une autre enzyme, l'intégrase. S'ensuit l'expression du matériel génétique et donc la production de deux polypeptides viraux qui sont alors clivés par la protéase VIH-1 pour donner les protéines structurales et les enzymes virales. L'assemblage de ces briques élémentaires se fait alors grâce à la cellule hôte et une fois le virus entier, il peut se propager et infecter d'autres cellules. Ce cycle entraîne la mort des cellules hôtes et, lorsque le VIH tue plus de cellules que le corps en produit, le système immunitaire devient alors déficient. En d'autres termes, l'individu infecté évolue vers le SIDA, phase ultime de la maladie.

La multi thérapie HAART combine différents médicaments qui ciblent les phases clés du cycle de reproduction du VIH mentionnées précédemment. Ces médicaments sont pour la plupart des inhibiteurs d'enzymes virales qui empêchent le bon déroulement des différentes étapes. Par exemple, en bloquant l'intégrase, l'ADN viral ne peut fusionner avec le génome humain et par conséquent ne peut être exprimé. On parvient, dans le meilleur des cas, à faire baisser la concentration du virus dans

le sang en dessous du seuil de détection, mais non à l'éradiquer complètement. De plus le virus tend à développer des résistances ce qui pousse les chercheurs à chercher des alternatives aux produits existants.

Le design d'inhibiteur repose actuellement sur le postulat de Pauling (1946) qui suggère que les enzymes sont des molécules dont la structure est complémentaire de celle des complexes activés des réactions qu'ils catalysent, c'est-à-dire de la configuration moléculaire intermédiaire entre celles des substrats et celles des produits de réactions des processus catalysés.<sup>2</sup> Cette théorie, reprise par Jencks en 1966, propose l'existence d'inhibiteur d'enzyme fonctionnant comme des analogues des états de transitions de peptidolyse.<sup>3</sup> En s'appuyant sur ces idées, divers groupes fonctionnels ont été étudiés et proposés comme analogues des états de transition de peptidolyse et quelques-uns d'entre eux ont été retenus pour le design d'inhibiteurs de protéases aspartiques, classe à laquelle appartient la protéase VIH-1.<sup>4,5</sup> Dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons à un groupement fonctionnel inhabituel ou plutôt à une interaction entre deux groupements fonctionnels qui présente des propriétés électrostatiques proches de celles d'un état de transition de peptidolyse par une protéase aspartique.<sup>6,7</sup> Le but de ce premier travail de thèse est d'améliorer l'accès synthétique d'un candidat inhibiteur présentant cette interaction entre une amine tertiaire et un groupement carbonyle (interaction *NCO*) et de développer une approche modulaire de cette synthèse pour permettre l'accès futur à un grand nombre de composés.

## 2. Conception d'un nouvel oligomère

Depuis une quarantaine d'années, les recherches portant sur la structure et le mode d'action de nombreuses biomolécules se sont multipliées aboutissant à une connaissance accrue des mécanismes du vivant et donnant notamment lieu au prix Nobel de Chimie en 2009. Ces nombreux travaux ont permis d'établir des liens entre les structures primaires, secondaires et tertiaires des biomolécules et leurs fonctionnalités. L'ADN, les protéines, les polysaccharides ont, en effet, des structures primaires relativement simples ; il s'agit d'assemblage, respectivement, de nucléotides, d'acides aminés ou de sucres dont la diversité est limitée. Cependant ces assemblages adoptent des structures très diverses et en même lieu obtiennent des fonctionnalités extrêmement variées.

Parallèlement à ces découvertes issues du vivant, les chercheurs ont entrepris de synthétiser de toutes pièces des oligomères pouvant adopter des structures tridimensionnelles bien particulières. De par leur nature synthétique, ces molécules sont susceptibles d'accéder à des structures et des fonctionnalités nouvelles. De nombreux types de monomères différents ont été envisagés pour diversifier au plus les types de structures finales. La plupart des travaux dans le domaine sont basés sur

des chainons présentant une forte similarité avec des molécules naturelles comme les  $\beta$ -peptides<sup>8-10</sup>, les  $\gamma$ -peptides<sup>11</sup> et les *peptoids* ( $\alpha$ -peptides dont les amines sont tri-substituées)<sup>12-14</sup>. D'autres se sont focalisés sur des constructions totalement différentes comme les aedamères (*aromatic electron donor-acceptor*, qui adoptent une structure secondaire grâce aux interactions  $\pi$  donneur-accepteur)<sup>15</sup>, les polyamides aromatiques<sup>16,17</sup> ou les oligo(m-phénylène-éthylène)<sup>18</sup>.

Certains de ces foldamères biomimétiques se sont révélés être des candidats potentiels pour l'obtention d'agents thérapeutiques en imitant des fonctionnalités de protéines tout en étant moins susceptibles à l'action de protéases par exemple.<sup>19</sup> Cependant beaucoup reste à faire pour comprendre les relations structures-propriétés et ainsi pouvoir prévoir les structures et fonctionnalités lors du design de telles molécules. D'autre part, il apparaît primordial d'observer ces phénomènes dans des milieux physiologiques ou tout du moins dans des milieux aqueux. Une toute petite partie seulement des foldamères conçus présentent cette faculté. L'objectif de ce second travail de thèse est de concevoir une nouvelle famille de macromolécules susceptibles d'adopter une structure secondaire dans un milieu aqueux. Pour l'instant les foldamères existants utilisent pour la plupart des interactions faibles de l'ordre de 0,1 à 10 kJ.mol<sup>-1</sup> pour permettre le repliement de la macromolécule, comme les liaisons hydrogènes ou les interactions aromatiques. Nous tenterons d'utiliser une interaction rencontrée dans les milieux aqueux entre un groupement carbonyle et une amine tertiaire (interaction *NCO*) qui serait plus intense que les liaisons citées précédemment (de l'ordre de 40 kJ.mol<sup>-1</sup>).<sup>20,21</sup> Il s'agit donc de trouver une maille élémentaire qui, une fois assemblée, présentera une succession de groupements carbonyles et d'amines tertiaires.



## Chapitre 1. L'interaction amine tertiaire – carbonyle (ou *NCO*)

L'interaction *NCO* est une interaction entre une amine tertiaire et un groupement carbonyle. Cette interaction a été décrite comme une homoconjugaison spatiale dans laquelle la densité électronique est transférée de l'orbitale non liante  $n$  de l'azote vers l'orbitale antiliante  $\pi^*$  du carbonyle (Figure 1.1).<sup>22</sup> Cette interaction induit la formation d'un nouveau dipôle caractérisé par : (a) un ordre de liaison entre 0 et 1 pour la liaison C-N ; (b) un ordre de liaison entre 1 et 2 pour la liaison C-O ; (c) une hybridation intermédiaire du C entre  $sp^2$  et  $sp^3$  ; et (d) l'apparition de charges partielles sur l'azote et l'oxygène créant ainsi un moment dipolaire renforcé.

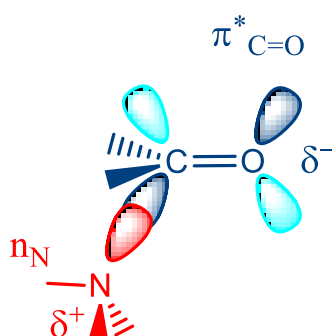


Figure 1.1. Représentation des orbitales atomiques et moléculaires mis en jeu dans l'interaction *NCO*.

Les études menées sur des substrats naturels et synthétiques ont montré que cette interaction prend place dans les milieux polaires protiques<sup>23,24</sup>, lorsque la distance entre l'amine et le carbonyle est inférieure à la somme des rayons de van der Waals des atomes d'azote et de carbone, soit 320 pm, et si la géométrie permet le recouvrement des deux orbitales mises en jeu. Ce chapitre présente un rappel bibliographique détaillé de cette interaction.

### 1. Premières observations

L'interaction *NCO* fut supposée pour la première fois en 1922 par Kermack et Robinson<sup>25</sup> au sein de la clivorine et de la protopine (Figure 1.2) pour expliquer les faibles basicité et réactivité de ces



aminocétone cycliques comportant respectivement huit et dix atomes. Ces hypothèses furent reprises par Huisgen, Wieland et Eder<sup>26</sup> lors de leurs études sur la vomicine qui comporte également une aminocétone cyclique à neuf membres et qui présente les mêmes propriétés originales, que sont une non réactivité de la cétone et une faible nucléophilie de l'amine vis-à-vis de l'iodométhane.

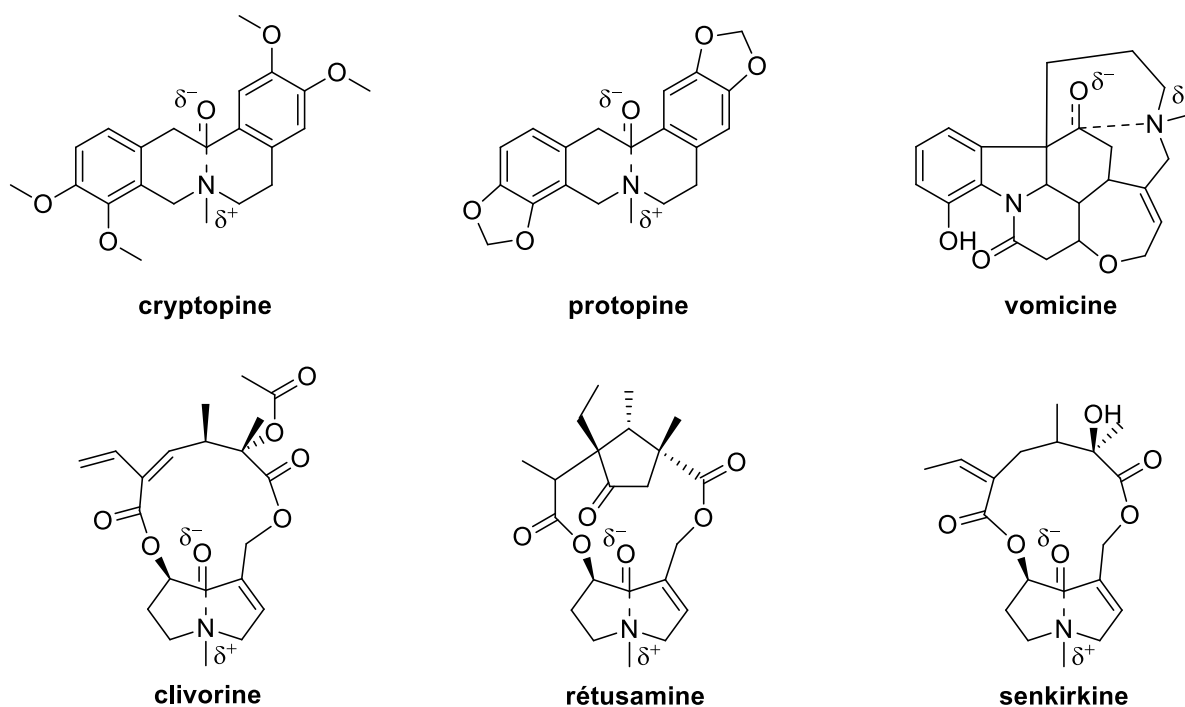


Figure 1.2. Quelques alcaloïdes présentant une interaction NCO.

Comme on peut le remarquer, ces premières observations furent réalisées sur des composés présentant une interaction trans-annulaire, c'est-à-dire un rapprochement de deux fonctions chimiques non adjacentes appartenant à un même cycle. Il fut également constaté que ces interactions peuvent conduire à la formation d'une liaison covalente lors de la protonation du composé en question. On parle alors de réaction trans-annulaire.

Ces résultats furent confortés dans les années 60 et 70 par l'avènement des données cristallographiques qui mirent en évidence une très forte proximité des groupements fonctionnels amine et carbonyle. Les structures de nombreux alcaloïdes furent résolues, dont la rétusamine<sup>27</sup>, la protopine<sup>28</sup>, la cryptopine<sup>29</sup>, la clivorine<sup>30</sup> et la senkirkine<sup>31</sup> (Tableau 1.1).

Tableau 1.1. Données cristallographiques d'alcaloïdes présentant une interaction NCO.

Composé	$d_{\text{CN}}$ (pm)	Ref
cryptopine	258	29
protopine	255	28
senkirkine	229	31
clivorine	199	30
rétusamine	164*	27
* Acide conjugué		

Aujourd'hui encore, de nouvelles structures d'alcaloïdes présentant une telle interaction trans-annulaire sont régulièrement découvertes dans des végétaux<sup>32,33</sup> ou des organismes marins<sup>34-38</sup>. Elles font fréquemment l'objet de synthèses totales.

### 1.1. Réactivité

Cherchant à mieux comprendre cette interaction, Leonard<sup>20</sup> initia et développa une étude physico-chimique exhaustive de cette dernière à l'aide d'aminocétones et d'aminoacycloïnes cycliques non naturelles. Dans un premier temps, ses études portèrent sur des aminoacycloïnes cycliques aisément synthétisables et ayant un nombre impair de chaînons.<sup>39</sup> Il s'avéra que seuls les composés à neuf membres résistent à l'oxydation à la liqueur de Fehling, à l'oximation et à la substitution nucléophile avec l'iodométhane, exactement comme les composés de la Figure 1.2. Ces observations permirent d'envisager une interaction conférant à la molécule des propriétés à mi-chemin entre celles d'une aminocétone classique et celles d'une fonction aminoalcool géminale. On observe par exemple, une protonation sur l'oxygène et non sur l'azote lors de l'acidification du milieu réactionnel, conduisant alors à une réaction trans-annulaire (Figure 1.3).

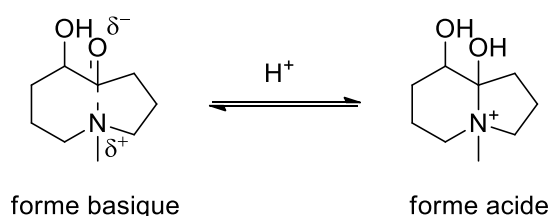


Figure 1.3. Equilibre acido-basique : formation d'une liaison covalente par protonation.

Plus récemment, la méthylation fut retenue mais les tentatives avec MeI échouèrent de nouveau. Néanmoins, l'utilisation d'un réactif plus dur comme  $\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$  permit de parvenir à la méthylation.<sup>40</sup> L'analyse révéla une *O*-méthylation exclusive par rapport à la *N*-méthylation (Figure 1.4).

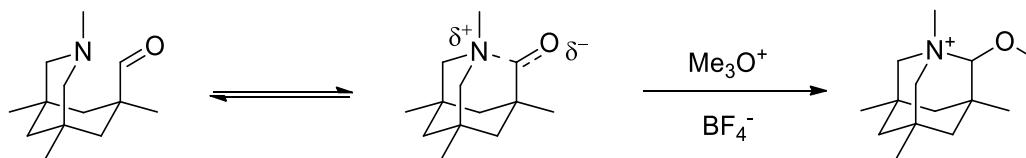


Figure 1.4. Méthylation étudiée par Kirby.

## 1.2. Influence de la pré-organisation et des substituants

Leonard se pencha également sur l'importance de la pré-organisation et de la taille des cycles afin d'observer une interaction trans-annulaire. Il s'avéra que l'amine et le carbone du carbonyle doivent former deux cycles thermodynamiquement favorisés, soit de 5 ou de 6 carbones pour qu'il y ait une interaction (Figure 1.5).<sup>20,41,42</sup>

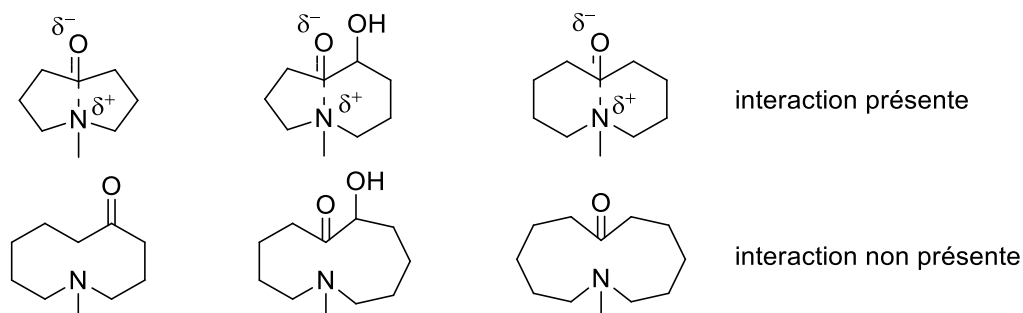
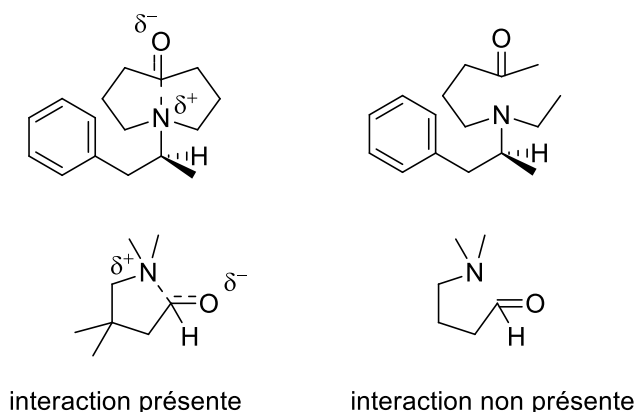


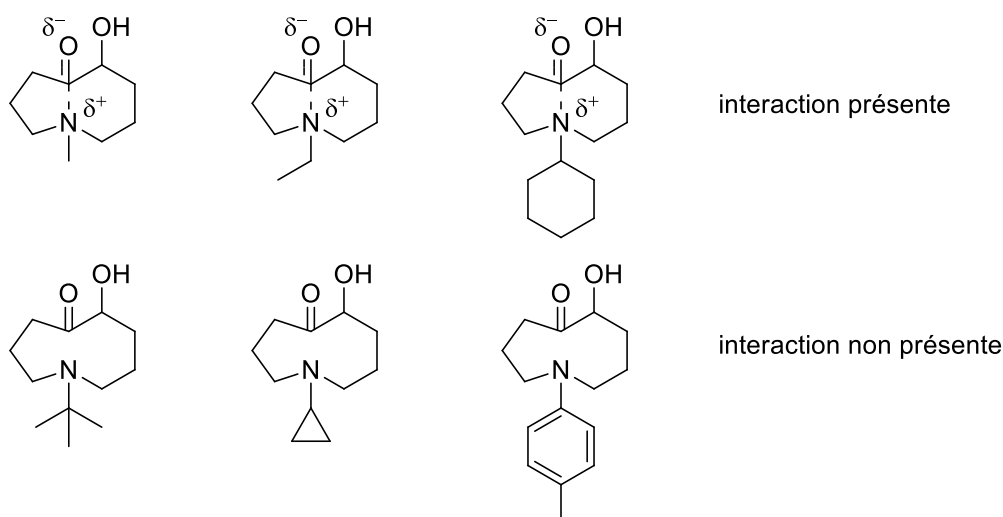
Figure 1.5. Influence de la taille des cycles : étude de Leonard.

En revanche, ces observations ne sont valables uniquement que pour des composés cycliques. Dans le cas de composés acycliques, seule une forte pré-organisation permet l'observation de l'interaction *NCO* (via un effet Thorpe-Ingold par exemple). En effet, il faut que le gain enthalpique issu de l'interaction soit supérieur à la perte d'entropie associée au repliement d'une chaîne ne présentant aucun élément de pré-organisation (Figure 1.6).<sup>43,44</sup>



**Figure 1.6. Observations de l'interaction NCO dans des composés acycliques.**

Dans le cadre de son étude exhaustive, Leonard étudia également l'influence du substituant de l'azote sur toute une gamme de dérivés du 1-azacyclononane-5-ol-6-one (Figure 1.7).<sup>20,45,46</sup>



**Figure 1.7. Influence des substituants de l'amine sur l'interaction NCO.**

Comme on peut l'observer, la gêne stérique permet d'expliquer certains de ces résultats : plus le substituant est encombrant, moins l'approche entre l'amine et le carbonyle est possible. Cependant l'interaction est bien présente dans le cas du cyclohexyle, alors qu'elle ne l'est pas dans le cas du phényle, qui est pourtant moins volumineux. Il faut donc également prendre en compte l'aspect électro-attracteur ou électro-donneur du substituant envers l'amine. Plus simplement, il suffit de regarder la basicité des amines pour se rendre compte de la situation : la cyclohexylamine ( $pK_a = 10,6$ ) étant plus basique que l'aniline ( $pK_a = 4,63$ ), le doublet non liant de la cyclohexylamine est plus susceptible d'interagir avec le carbonyle.

## 2. Analyses spectroscopiques

Ces premières observations s'appuient sur des réactivités anormales et des données infrarouges (IR). Les hypothèses seront ensuite confirmées grâce aux données cristallographiques puis par l'avènement de la RMN en tant qu'instrument de routine.

### 2.1. IR

En parallèle des étranges propriétés de réactivités des premiers alcaloïdes présentant l'interaction *NCO*, un comportement IR particulier est observé, notamment pour les fréquences de vibration des cétones. En effet, pour la cryptopine, la protopine et la *N*-méthylpseudo-strychnidine, les fréquences mesurées sont inférieures de 20 à 30  $\text{cm}^{-1}$  à celles normalement mesurées pour des cétones non conjuguées.<sup>28,29</sup> L'IR en solution ( $\text{CCl}_4$ ) est alors largement utilisée pour justifier la présence ou non de l'interaction *NCO* au sein d'aminocétone cycliques à 8, 9, 10, et 11 membres. On observe également la disparition de la bande de vibration de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  et l'apparition d'une bande de vibration d'une liaison  $\text{O}-\text{H}$  lorsqu'on protone la molécule, créant ainsi la liaison  $\text{OH}$ .

Par ailleurs, la corrélation entre la distance  $\text{N}-\text{C}$  et la fréquence de vibration du carbonyle, présentée dans la Figure 1.8 paraît tout à fait remarquable : plus l'interaction est forte (plus l'amine et le carbonyle sont proches) et plus la liaison  $\text{C}=\text{O}$  est faible, ce qui entraîne une diminution de sa fréquence de vibration.

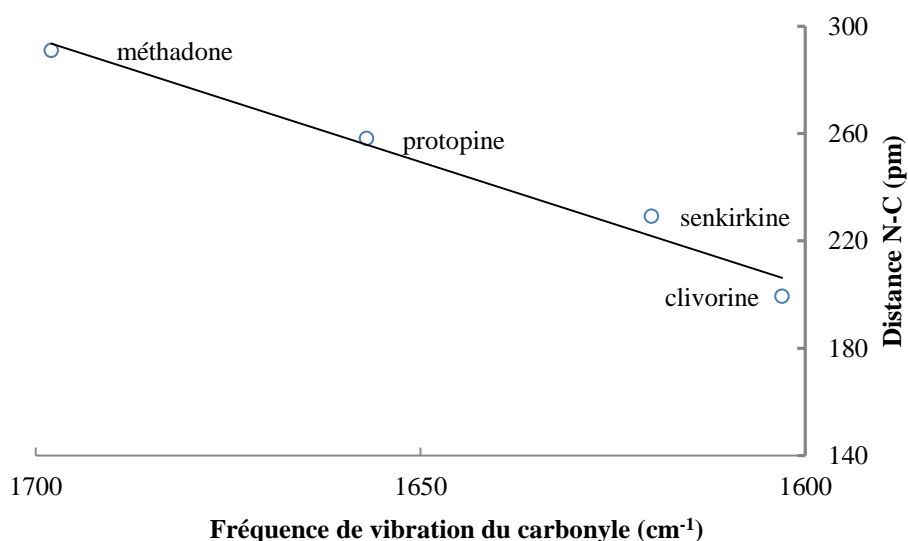
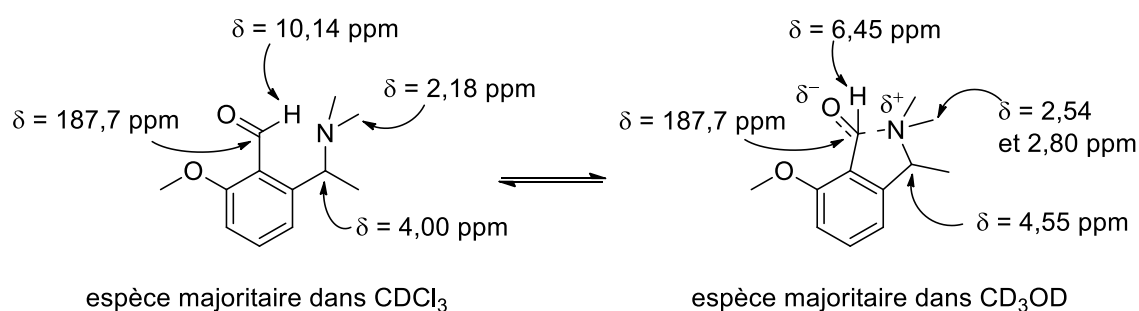


Figure 1.8. Corrélation entre la fréquence de vibration du carbonyle et la distance  $\text{N}-\text{C}$

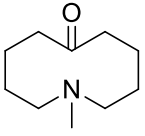
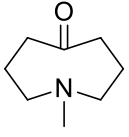
## 2.2. RMN

A partir des années 1970, avec la banalisation de la RMN, les études spectroscopiques de l'interaction *NCO* se multiplient et de nombreux phénomènes associés à cette interaction sont observés. On constate en effet en RMN  $^1\text{H}$  des déplacements chimiques modifiés pour les protons à proximité du carbonyle ou de l'amine participant à l'interaction *NCO* et en RMN  $^{13}\text{C}$  des déplacements chimiques modifiés pour le carbone impliqué dans l'interaction et pour ceux à proximité. Dans le cas des aminoaldéhydes, la RMN  $^1\text{H}$  se révèle être une technique très fiable, puisque le déplacement chimique du proton aldéhydique passe d'environ 10 ppm à environ 6,5 ppm tandis que les déplacements chimiques des protons à proximité de l'amine ne sont que légèrement modifiés (shift entre 0.3 et 0.8 ppm) (Figure 1.9).<sup>44,47</sup>



**Figure 1.9. Déplacements chimiques de différents protons et carbones pour la forme ouverte et la forme fermée.**

On peut donc voir par RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , mais également  $^{17}\text{O}$  si l'interaction *NCO* est présente.<sup>47,48</sup> Cependant il convient d'être prudent dans l'interprétation des résultats. En effet, on pourrait s'attendre à ce que l'intensité de l'interaction affecte l'amplitude de la variation de déplacement chimique comme pour l'IR. On observe cependant une variation de déplacement chimique plus forte dans le cas d'une aminocétone cyclique à dix membres que dans le cas du dérivé à huit membres alors que celui-ci est connu pour avoir la plus forte interaction *NCO* (Figure 1.10).<sup>22,49</sup> Ceci s'explique par le fait que le déplacement chimique dépend également d'un nombre élevé de paramètres, dont par exemple la solvation de la molécule (qui dépend de la taille du cycle).

	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^{17}\text{O}$
	$\Delta\delta = 82 \text{ ppm}$	$\Delta\delta = 12 \text{ ppm}$
	$\Delta\delta = 60 \text{ ppm}$	$\Delta\delta = 8 \text{ ppm}$

$\Delta\delta = |\delta_{\text{amino-cétone}}| - |\delta_{\text{cétone}}|$   
 $\delta_{\text{amino-cétone}}$  et  $\delta_{\text{cétone}}$  sont les valeurs respectives du déplacement chimique  
 (en RMN  $^{13}\text{C}$  ou  $^{17}\text{O}$ ) de l'amino-cétone et de la cétone correspondante  
 ne présentant pas d'interaction NCO

Figure 1.10. Variation des déplacements chimiques du carbone et de l'oxygène du carbonyle engagés ou non dans une interaction NCO.

### 3. Effet du solvant et équilibre conformationnel

Les premières observations de l'effet du solvant furent celles de Bell et Archer<sup>23</sup> lors de l'étude des spectres UV de la 3 $\alpha$ -phényl-3 $\beta$ -tropanylphénylcétone (Figure 1.11). Cette étude permit de montrer que la conformation bateau est observée dans le méthanol mais pas dans le dichlorométhane. La création d'un dipôle lors de la formation de l'interaction NCO est en effet plus favorisée dans les solvants polaires protiques que dans les solvants apolaires. Des études plus récentes sur la gelsempervine A<sup>32</sup> ont conduit à des observations similaires en spectroscopie UV.

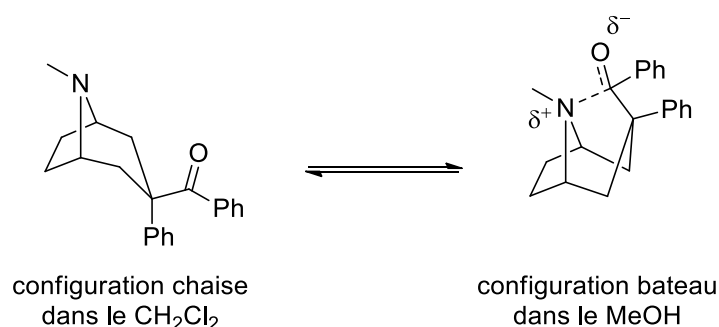


Figure 1.11. Composé étudié par Bell et Archer.

Les études RMN ont alors permis de clarifier cet effet de solvant et d'évaluer l'influence de ce dernier sur la force de l'interaction. Les études de McCrindle et McAlees illustrant le repliement d'une molécule très simple, le 3,3-diméthyl-4-diméthylaminobutanol (Figure 1.12), permirent de se rendre compte que l'on assiste à un réel équilibre conformationnel puisque les deux formes sont

observables.<sup>44</sup> Il est en effet possible, grâce à la grande sensibilité de la RMN, de comparer les intégrales des protons caractéristiques de la forme ouverte et de la forme fermée.

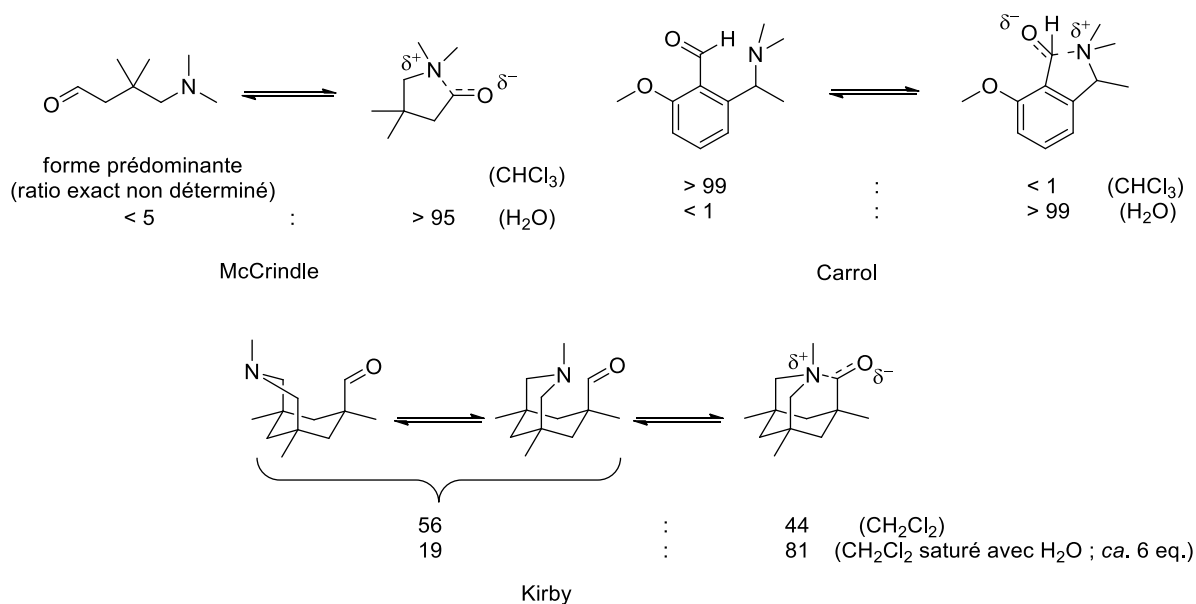


Figure 1.12. Equilibre conformationnel de différents composés dans divers solvants.

Dans le cas des molécules de McCrindle et de Carrol, les études furent effectuées dans des solvants aux propriétés diamétralement opposés (l'eau est polaire protique alors que le chloroforme est apolaire aprotique). Les études de Davies, Kirby et Komarov se focalisèrent sur l'équilibre conformationnel entre deux formes ouvertes de type aminoaldéhyde et une forme fermée de type adamantane.<sup>50</sup> Et un simple changement entre un solvant anhydre et un solvant saturé en eau entraîne un changement d'équilibre.

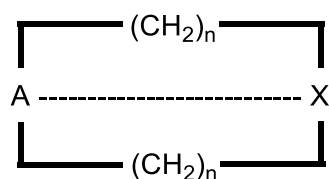
#### 4. Application : Angle de Bürgi-Dunitz

L'étude la plus célèbre, utilisant l'interaction *NCO*, est sans conteste le calcul de l'angle d'approche d'un nucléophile sur un carbonyle, appelé désormais l'angle de Bürgi-Dunitz, auteurs de cette étude.<sup>24,51,52</sup> Ils initièrent, au début des années 1970, une méthode permettant de mettre en corrélation la structure cristallographique des molécules et la dynamique des réactions intermoléculaires.





Réaction bimoléculaire



Interaction transannulaire

Figure 1.13. Analogie interaction transannulaire et réaction bimoléculaire.

Lors d'une réaction bimoléculaire  $A + X \rightarrow A-X$ , on observe une déformation de X à l'approche de A et inversement. Dans le cas d'une interaction transannulaire dans un cristal, on peut considérer qu'il s'agit des positions d'approche de deux réactifs A et X à mi-chemin entre l'état initial et l'état final. On peut donc, en collectant un grand nombre de structures cristallographiques possédant des interactions transannulaires entre A et X, les organiser selon une série de distances décroissantes afin de constituer une série de positions de A en fonction de X lors de l'approche des deux groupements fonctionnels.

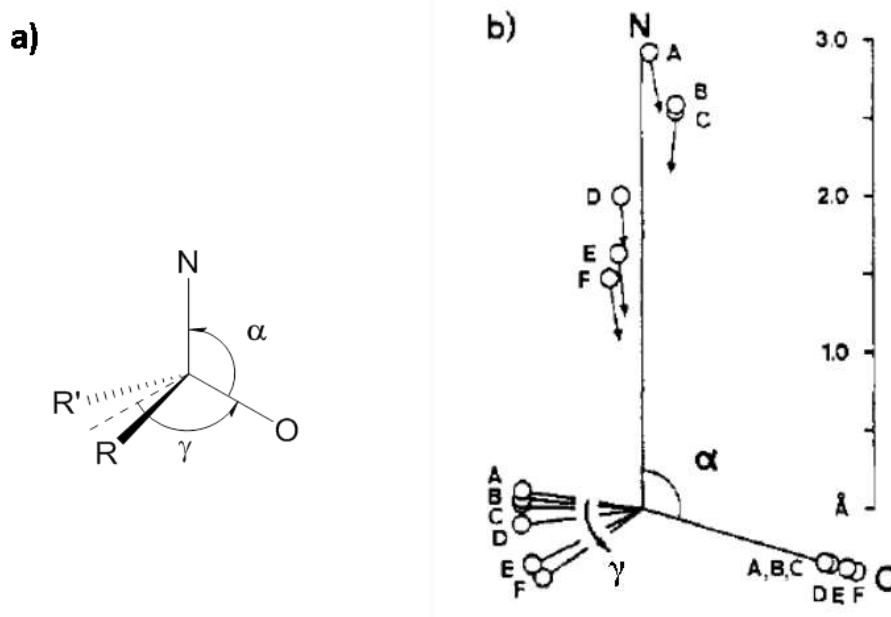
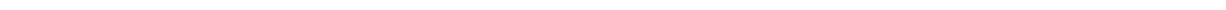


Figure 1.14. a) Définition des symboles (la ligne pointillée est la bissectrice de RCR') b) Projection sur le plan NCO des positions de l'azote (en haut, avec la direction estimée de la paire d'électron libre), de l'oxygène (en bas à droite) et de la bissectrice RCR'.<sup>51</sup>

En appliquant cette méthode aux différentes structures cristallines disponibles (A : méthadone, B : cryptopine, C : protopine, D : clivorine, E : rétusamine, F : N-brosylmitomicyne A) où on observe l'interaction NCO, il est possible de cartographier la coordonnée de réaction de l'addition d'une amine

tertiaire sur un dérivé carbonylé. La Figure 1.14, extraite d'un article de Dunitz et Bürgi, permet de rendre compte de l'angle d'approche en fonction de la distance de l'amine sur le carbonyle dans l'interaction *NCO*, angle qui reste à peu près constant (aux alentours de  $107 \pm 5^\circ$ ). Cette étude peut être généralisée pour toute approche d'un nucléophile sur un carbonyle.



**Partie I : La liaison réversible *NCO*  
appliquée au domaine de l'inhibition  
d'enzymes**



## Chapitre 2. La protéase VIH-1 : une cible de choix

### 1. Protéases

Les protéases (ou peptidases ou enzymes protéolytiques) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'une liaison peptidique avec une grande sélectivité et efficacité. Il existe plusieurs grandes familles de protéases, qui sont classées selon leur mode d'action et selon la nature de leur machinerie catalytique. On distingue ainsi les métallo-protéases (34 %) qui, comme leur nom l'indique, possèdent un cation métallique, les protéases à sérine (26 %), les protéases à thiol (26 %), les protéases aspartiques (4 %) et les protéases à thréonine (5 %).<sup>53,54</sup> Chaque protéase est plus ou moins sélective envers une liaison d'une chaîne peptidique bien définie. Cette liaison est appelée la liaison scissile. La sélectivité des enzymes provient de leur habilité à reconnaître des résidus d'acides aminés entourant cette liaison scissile grâce à leurs sous-poches enzymatiques qui sont complémentaires de ces résidus. Grâce à la nomenclature de Schechter et Berger (Figure 2.1), on peut associer chaque sous-poché enzymatique au résidu d'acide aminé dont il est complémentaire.<sup>55</sup> Les résidus d'acides aminés situés entre la liaison scissile et l'extrémité N-terminale du peptide sont notés  $P_1, P_2, \dots$  en partant de la liaison scissile, et respectivement les résidus situés entre la liaison scissile et l'extrémité C-terminale sont notés  $P_1', P_2', \dots$ . Ceux-ci sont complémentaires avec les sous-poches enzymatiques  $S_1, S_2, \dots$  et  $S_1', S_2', \dots$  respectivement.

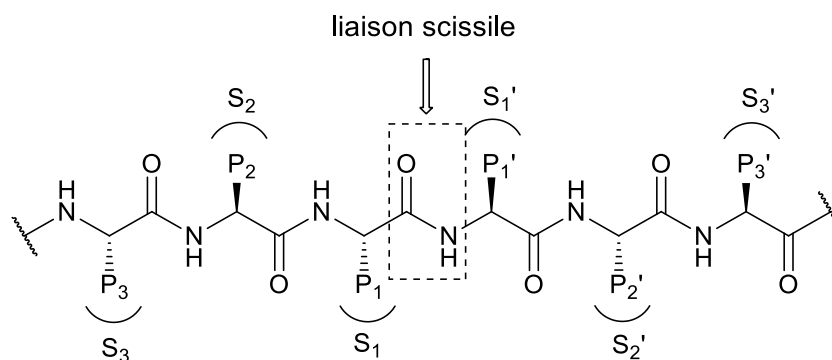


Figure 2.1. Nomenclature de Schechter et Berger.

On peut également classer les protéases en fonction de la position où elles clivent leurs substrats. On peut ainsi différencier les exoprotéases qui clivent un acide aminé terminal (aminoprotéase lorsqu'elle clive l'acide aminé N-terminal et carboxypotéase lorsqu'elle clive l'acide aminé C-terminal) des endoprotéases qui coupent des liaisons plus éloignées des terminaisons. Ces différentes caractéristiques des protéases concernant la dégradation des peptides en font des régulateurs essentiels dans de nombreux processus biologiques. On retrouve de telles enzymes dans la plupart des organismes vivants, de l'être humain aux procaryotes, en passant par les virus. Le dysfonctionnement d'une d'entre elles peut alors être à l'origine de maladies (baisse de l'activité des caspases dans les cancers, empêchant l'apoptose des cellules malades) ou permettre de lutter contre un organisme intrus (l'inhibition de plasmepsines dans le traitement du paludisme). Le tableau 2.1 présente un aperçu de quelques protéases, avec leurs familles d'appartenance, leur fonction et la maladie dans laquelle elles sont impliquées.<sup>56,57</sup>

**Tableau 2.1. Exemples de peptidases impliquées dans certaines maladies.**

Protéase	Famille	Fonction	Maladie associée
Protéase VIH-1	Asp	Réplication VIH	SIDA
Rénine	Asp	Fabrication d'angiotensine I	Hypertension
Thrombine	Ser	Coagulation sanguine	Infarctus
Tryptases	Ser	Phagocytose	Asthme
Cathépsine K	Cys	Ostéolyse (destruction du tissu osseux)	Ostéoporose
ACE	Zinc	Fabrication d'angiotensine II	Hypertension
Plasmepsines	Asp	Dégradation d'hémoglobine	Paludisme
$\beta$ -Sécrétase	Asp	Synthèse d'Amyloid $\beta$	Alzheimer
Caspase	Cys	Apoptose	Cancer

## 2. Protéases aspartiques

Les protéases aspartiques sont des endoprotéases capables de complexer six à dix résidus d'acides aminés du peptide substrat. Comme leur nom l'indique, elles possèdent deux séquences Asp-Thr-Gly (ou Asp-Ser-Gly) dans lesquelles l'acide aspartique est responsable de l'activité catalytique. L'étude des cristaux montre que ces enzymes possèdent en général une structure dimérique avec deux lobes (identiques ou non) entourant le site actif (Figure 2.2).<sup>58</sup> Dans certains cas, dont les protéases rétrovirales, la structure bilobale provient de l'interaction non covalente de deux monomères identiques formant ainsi une structure homodimérique.<sup>59</sup>

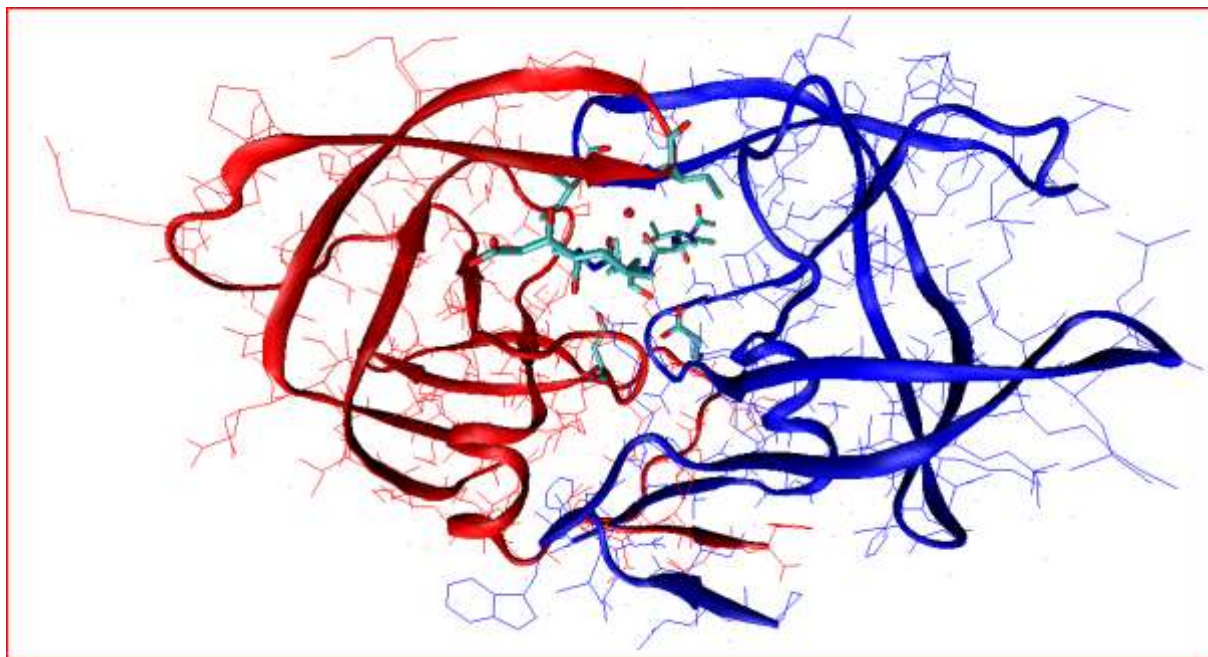


Figure 2.2. Structure bilobale homodimérique de la protéase du VIH-1 (entrée PDB : 5HVP).

Dans la forme active des protéases aspartiques, l'un des résidus des deux acides aspartiques est protoné tandis que l'autre ne l'est pas. On trouve également une molécule d'eau « catalytique » proche des deux résidus d'acide aspartique qui interviendra lors de l'hydrolyse du peptide (Figure 2.3).<sup>60</sup> Si l'on s'intéresse maintenant à l'autre côté de la cavité catalytique, on peut remarquer l'existence de deux volets flexibles (en haut sur la Figure 2.2) en structure d'épingle à cheveux.<sup>61</sup> Ces deux volets adoptent une conformation ouverte en l'absence de ligand et peuvent se refermer sur le substrat pour permettre la bonne orientation de celui-ci dans le site catalytique. Cette flexibilité particulière a donné lieu à des études poussées suivies par RMN. On trouve également entre le substrat et les volets une molécule d'eau structurale (appelée « *flap water* ») permettant une bonne liaison.<sup>5</sup> Dans la Figure 2.3, les lysines 50 et 50' sont celles appartenant aux deux volets et interagissant avec le substrat via la molécule d'eau structurale, dans l'exemple de la protéase du VIH-1.



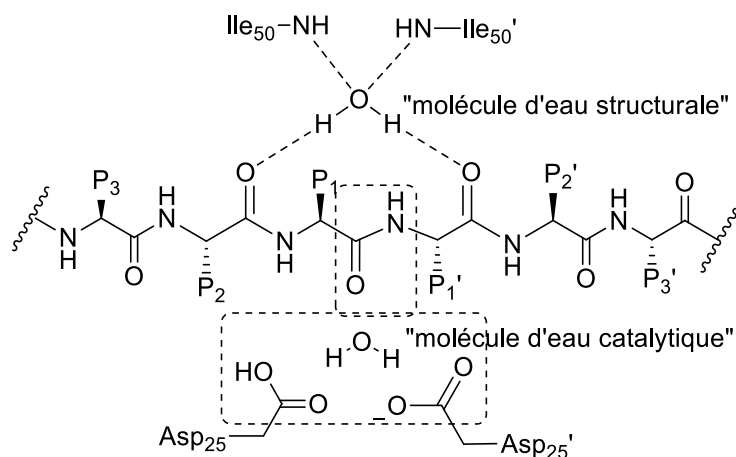


Figure 2.3. Substrat lié aux volets de la protéase par l'intermédiaire d'une molécule d'eau structurale.

Les protéases aspartiques exercent leur activité catalytique grâce à des interactions hydrogènes avec le peptide substrat et la molécule d'eau catalytique. Le mécanisme de peptidolyse, globalement reconnu, est décrit dans la Figure 2.4.<sup>62-65</sup> La première étape consiste à hydrater le carbonyle pour obtenir l'espèce intermédiaire tétraédrique **INT** en passant par l'état de transition **TS1**. La protonation de l'azote qui suit, après passage par le deuxième état de transition **TS2**, entraîne la rupture de l'ancienne liaison amide et la formation des deux produits de la réaction. On retrouve des mécanismes de type acido-basique avec des échanges de protons : le résidu carboxylate d'acide aspartique intervient en tant que base pour déprotoner la molécule d'eau catalytique (TS1) et pour déprotoner un hydroxyle de l'intermédiaire tétraédrique (TS2), tandis que le résidu acide intervient pour protoner l'oxygène du carbonyle (TS1) et puis protoner l'amine (TS2).

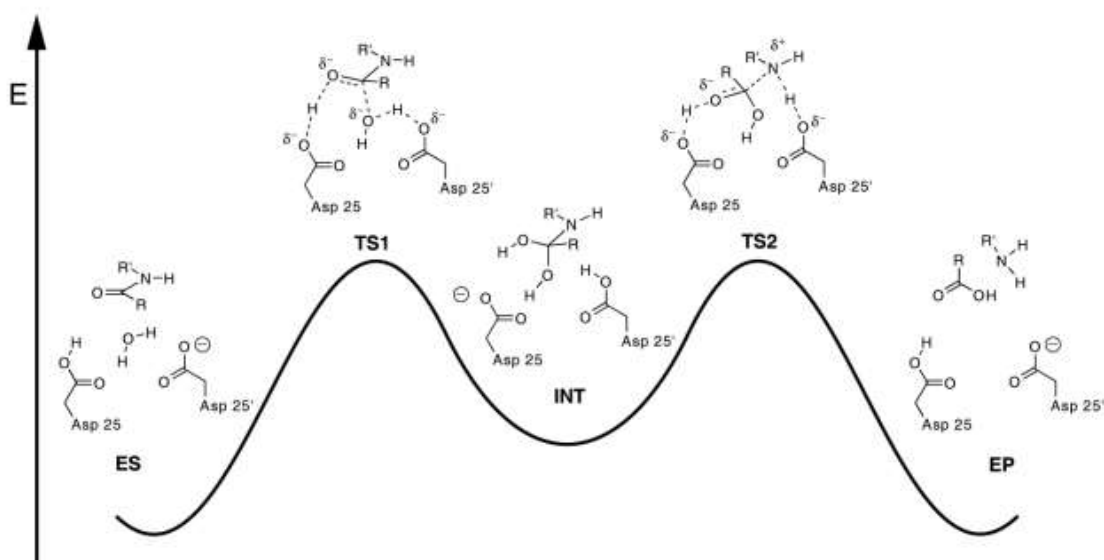


Figure 2.4. Profil énergétique du mécanisme de peptidolyse par les protéases aspartiques.

Une analyse plus poussée des états de transition fait ressortir le caractère pseudo-tétraédrique du carbone portant le ou les oxygènes du fait de l'hybridation intermédiaire du carbone entre un état  $sp^2$  et un état  $sp^3$ . Les deux états de transition sont également caractérisés par une liaison carbonyle anormalement longue (ordre de liaison entre 1 et 2) et par une charge partielle négative sur l'oxygène. En revanche, seul le deuxième état de transition présente une charge partielle positive sur l'azote et une liaison carbone-azote particulièrement longue (ordre de liaison entre 0 et 1).

### 3. Protéase VIH-1

La protéase VIH-1 est une protéase aspartique, qui, comme son nom l'indique, intervient dans le cycle de reproduction du VIH-1. Elle est constituée de deux monomères identiques de 99 acides aminés comportant chacun une hélice alpha et neuf feuillets bêta qui s'assemblent par des liaisons non covalentes pour former un homodimère symétrique (axe de symétrie C2). Son rôle est de cliver les polyprotéines virales Gag, Gag-Pol et le précurseur Nef.<sup>66</sup> La protéase reconnaît douze sites de coupures différents permettant ainsi de fournir les protéines virales finales (tableau 2.2).<sup>67-70</sup>

**Tableau 2.2. Site de clivage des polyprotéines virales Gag, Gag-Pol et du précurseur Nef par la protéase VIH-1.**

Site	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
MA/CA	Ser	Gln	Asn	<b>Tyr</b>	<b>Pro</b>	Ile	Val	Gln
CA/p2	Ala	Arg	Val	<b>Leu</b>	<b>Ala</b>	Glu	Ala	Met
p2/NC	Ala	Thr	Ile	<b>Met</b>	<b>Met</b>	Gln	Arg	Gly
NC/p1	Arg	Gln	Ala	<b>Asn</b>	<b>Phe</b>	Leu	Gly	Lys
p1/p6 <sup>gag</sup>	Pro	Gly	Asn	<b>Phe</b>	<b>Leu</b>	Gln	Ser	Arg
NC/TFP	Arg	Gln	Ala	<b>Asn</b>	<b>Phe</b>	Leu	Arg	Glu
TFP/p6 <sup>pol</sup>	Asn	Leu	Ala	<b>Phe</b>	<b>Gln</b>	Gln	Gly	Glu
p6 <sup>pol</sup> /PR	Ser	Phe	Ser	<b>Phe</b>	<b>Pro</b>	Gln	Ile	Thr
PR/RTp51	Thr	Leu	Asn	<b>Phe</b>	<b>Pro</b>	Ile	Ser	Pro
RTp51/RTp66	Ala	Glu	Thr	<b>Phe</b>	<b>Tyr</b>	Val	Asp	Gly
RTp66/INT	Arg	Lys	Val	<b>Leu</b>	<b>Phe</b>	Leu	Asp	Gly
Nef	Asp	Cys	Ala	<b>Trp</b>	<b>Leu</b>	Glu	Ala	Gln

Bien qu'il n'y ait pas de séquence préférée par la protéase VIH-1, on retrouve la préférence des protéases rétrovirales envers le site de clivage Aromatique-Pro (Aromatique = Tyr, Phe ou Trp),

préférence inhabituelle chez les endoprotéases mammifères. De plus, l'analyse des chaînes peptidiques clivées montre une préférence pour les résidus aliphatiques dans les positions P<sub>2</sub> et P<sub>2</sub>'.

#### 4. Inhibiteurs de protéases aspartiques

Le développement d'inhibiteurs d'enzyme bénéficie d'une double approche, à la fois théorique et expérimentale. D'un côté, le criblage de bibliothèques combinatoires dégage des molécules ayant un pouvoir inhibiteur moyen (*lead* ou *hit*) et qui sont ensuite améliorées si possible. En complément, l'étude structurale de l'enzyme et les études de docking permettent d'envisager des modifications des *leads*.<sup>71,72</sup> Si on en revient au Postulat de Pauling, la première étape consiste à choisir un motif chimique imitant l'état de transition de la peptidolyse et puis à incorporer des groupements latéraux pouvant interagir avec les sous poches enzymatiques voisines. Ces techniques ont été élaborées grâce à l'étude du fonctionnement des inhibiteurs naturels d'enzyme, dont la pepstatine qui est connue pour inhiber la plupart des protéases aspartiques. L'étude de la structure de la pepstatine (Figure 2.5) et de la structure cristalline du complexe protéase-pepstatine montre que le gamma acide aminé statine interagit avec les acides aspartiques de la protéase par liaison H avec son groupement hydroxyle.<sup>54</sup>

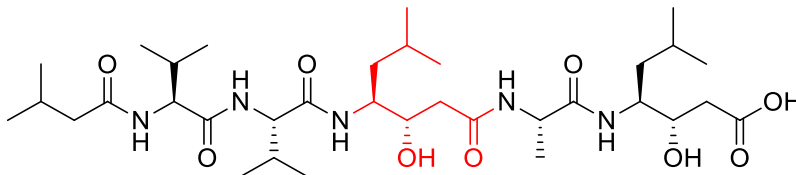


Figure 2.5. Structure de la Pepstatine (gamma acide aminé statine en rouge).

Le groupement hydroxyle de la statine peut alors être considéré comme un mime des états de transition (pseudo)tétraédriques de la peptidolyse.<sup>73</sup> L'interaction de ce groupement avec la machinerie catalytique conduit au déplacement de la molécule d'eau catalytique permettant ainsi une augmentation de l'affinité avec le site actif grâce à un gain entropique. La recherche d'autres groupements pouvant servir de mimes a permis de dégager un certain nombre de mimes potentiels, comme les hydroxyéthylamines, les hydroxyéthylènes, les amides réduites, les cétones  $\alpha$ -perfluorées, les  $\alpha$ -cétocarboxamides et certains composés phosphorés (Figure 2.6).<sup>5</sup> Tous ces groupements présentent un centre tétraédrique censé reproduire les propriétés structurales et stériques de l'état de transition, tout comme la statine. On peut ensuite jouer sur les groupements latéraux P et P' afin d'obtenir l'affinité désirée avec telle ou telle protéase aspartique.

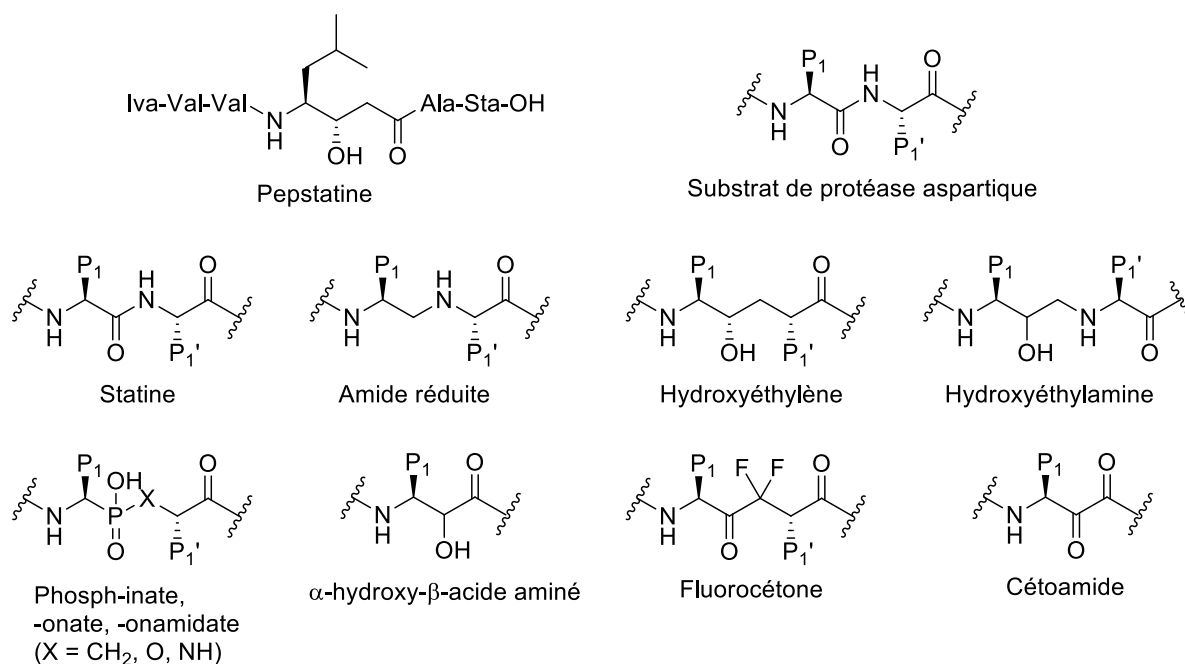


Figure 2.6. Différents mimes de l'état de transition utilisés dans la conception d'inhibiteurs de protéases aspartiques.

Les mimes d'états de transition possédant une espèce phosphorée sont ceux qui, en apparence, possèdent le plus de similarités avec les états de transition puisqu'en plus de la structure tétraédrique, ils possèdent également une pseudo charge négative sur les oxygènes et pourraient ainsi engager plus d'une interaction avec le site actif.<sup>74</sup> Cependant des calculs de propriétés électrostatiques ont démontré une trop grande différence avec celles des états de transitions.<sup>75</sup> De plus, leur instabilité à l'hydrolyse en milieu aqueux ne permet pas d'application pharmacologique. Des mimes décrits ci-dessus, les hydroxyéthylènes et les hydroxyéthylamines sont ceux qui sont les plus utilisés dans le design d'inhibiteurs de protéases aspartiques.<sup>76</sup> Pour la protéase VIH-1, le design des inhibiteurs commercialement disponibles repose sur le remplacement de la séquence Phe-Pro par un mime d'états de transition et huit d'entre eux possèdent un mime de type hydroxyéthylène ou hydroxyéthylamine (Figure 2.7).<sup>57,67</sup>

Les toutes premières tentatives de design d'inhibiteurs reposaient sur l'utilisation de chaînes peptidiques avec le remplacement de la liaison scissile par un mime d'états de transition. Malheureusement ces inhibiteurs peptidomimétiques possédaient une biodisponibilité orale faible et de par leur nature peptidique et leur taille, ils étaient fortement sensibles aux différentes machineries peptidolytiques. Il est maintenant reconnu qu'il faut des molécules de taille relativement faible (inférieures à 500 Daltons) et une lipophilicité moyenne à élevée (règles de Lipinski).<sup>77,78</sup> Les inhibiteurs décrits en Figure 2.7 suivent ces règles et ont effectivement une biodisponibilité raisonnable.

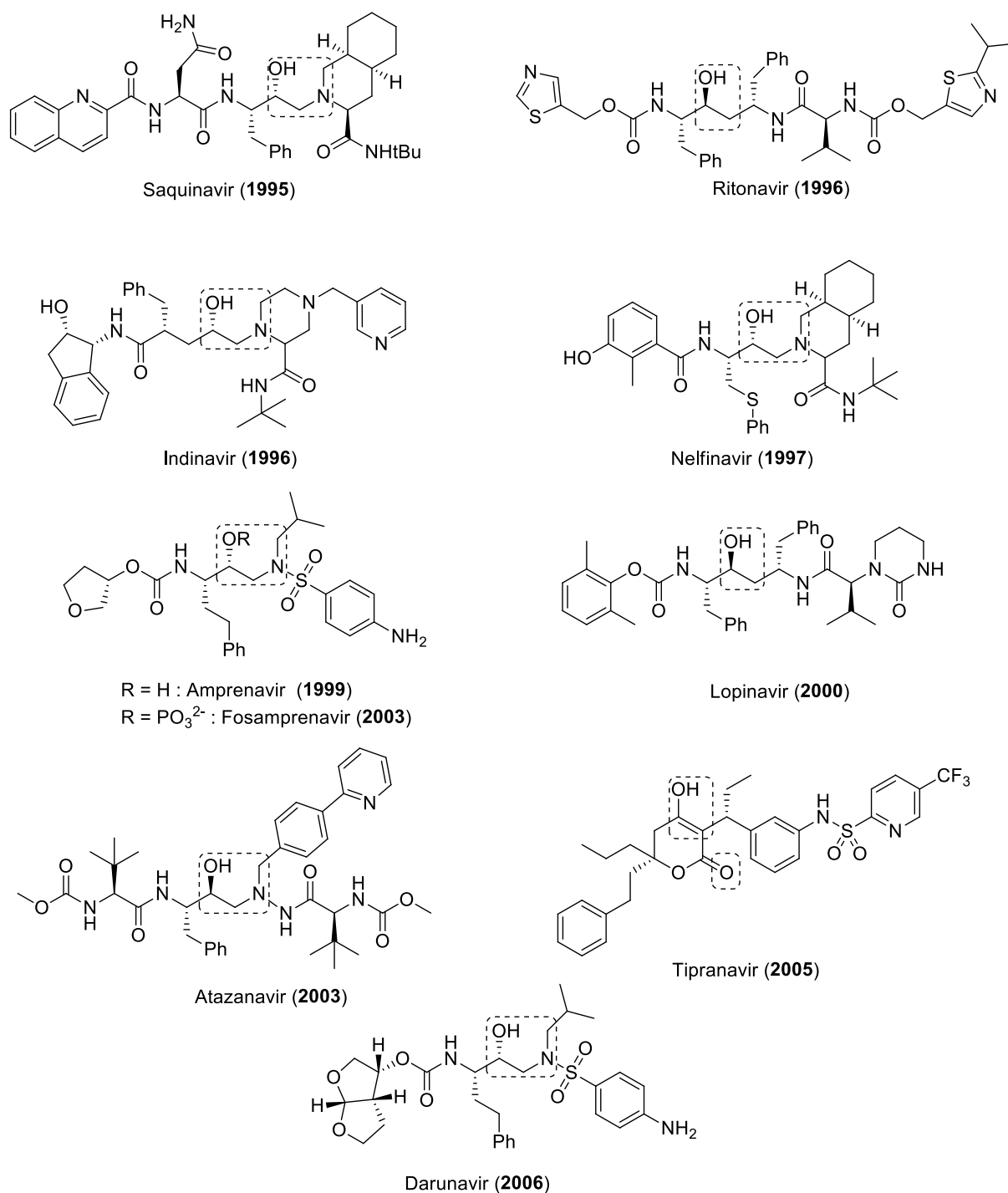


Figure 2.7. Inhibiteurs autorisés de la protéase du VIH-1 et date d'autorisation d'utilisation.

De plus, des inhibiteurs possédant une conformation restreinte adaptée au site actif de l'enzyme permettent d'augmenter leur affinité en réduisant le coût entropique lié à l'adaptation de la conformation du substrat à la forme du site actif. Ce gain d'entropie conformationnelle peut alors être utilisé pour diminuer la taille des inhibiteurs et ainsi améliorer la biodisponibilité orale.<sup>79</sup> Lam décrit une famille d'urées cycliques à sept membres conçues pour avoir une conformation stabilisant le mode

normal de fixation de type feuillet  $\beta$  mais remplaçant également la molécule d'eau structurale permettant de gagner encore en entropie (Figure 2.8).<sup>80,81</sup>

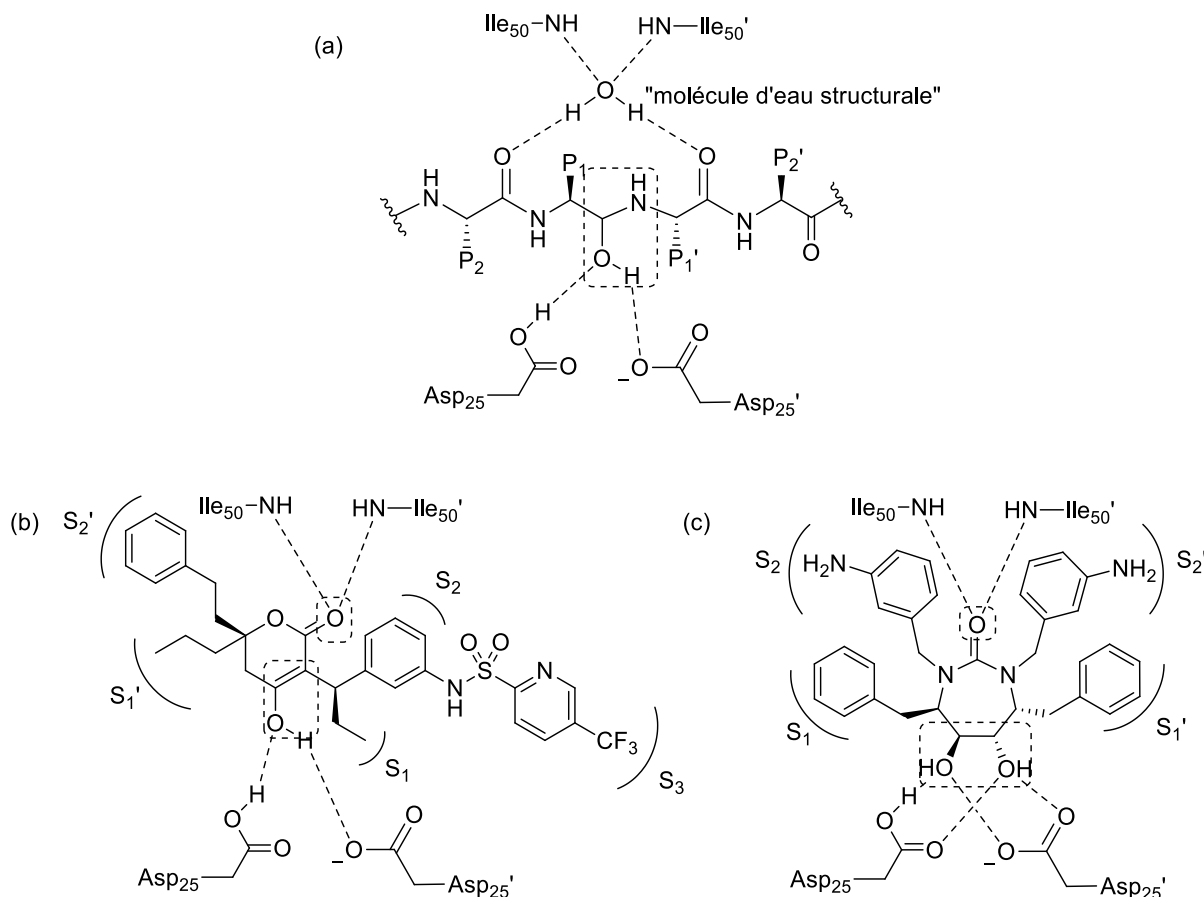


Figure 2.8. Mode de fixation dans le site actif de la protéase VIH-1 de : (a) une chaîne peptidique, (b) Tripanavir et (c) la DMP 450.

L'architecture moléculaire obtenue grâce au cycle à sept membres permet une adaptation des groupements benzyliques dans les sous poches enzymatiques S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>' et S<sub>2</sub>' et une interaction du groupement diol vicinal avec les résidus d'acides aspartiques catalytiques. Il est intéressant de noter ici, que la molécule DMP 450 possède une symétrie C<sub>2</sub> identique à celle de sa cible. On retrouve la stratégie de remplacement de la molécule d'eau structurale dans la structure du Tripanavir, premier inhibiteur de la protéase VIH-1 autorisé et n'étant pas issu de l'approche mime d'état de transition.

## 5. Inhibiteurs présentant un motif NCO

Il y a une dizaine d'années, commence l'aventure du design d'inhibiteur de protéases aspartiques possédant un mime d'états de transition particulier : l'interaction NCO. On observe en effet des caractéristiques électroniques et stériques similaires entre une interaction NCO et le deuxième

état de transition de la peptidolyse par une protéase aspartique : on retrouve ainsi (a) un ordre de liaison entre 0 et 1 pour la liaison C-N ; (b) un ordre de liaison entre 1 et 2 pour la liaison C-O ; (c) une hybridation intermédiaire du C entre  $sp^2$  et  $sp^3$  ; et (d) l'apparition de charges partielles sur l'azote et l'oxygène (Figure 2.9). L'incorporation d'une telle interaction pourrait enfin fournir un isostère d'état de transition convenable, ce qui décrit dans les inhibiteurs actuels qui comportent des isostères d'état de transition possédant, la plupart du temps, des caractéristiques stériques et électroniques bien différentes de l'état de transition ciblé.<sup>75,82-85</sup>

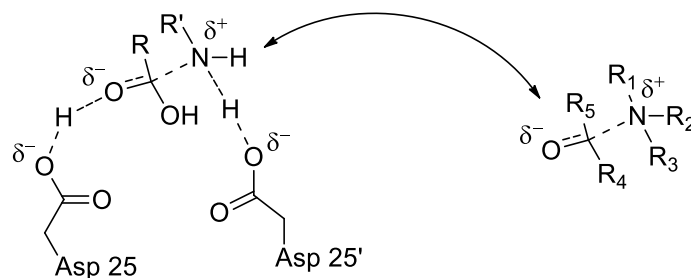


Figure 2.9. Analogie entre TS2 et interaction NCO.

Les premiers travaux sur ce sujet furent ceux de la thèse d'Arnaud Gautier centrés sur le développement d'un inhibiteur pour la protéase VIH-1 de type peptidomimétique.<sup>6,86</sup> Cette première étude permit d'obtenir une première génération d'inhibiteurs qui furent testés par la méthode FRET (*Fluorescence ou Förster Resonance Energy Transfer* avec pour référence la pepstatine). Des valeurs de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{M}$  (36 nM pour la pepstatine) furent atteintes avec succès. Malheureusement, les études RMN et UV montrèrent que la forme fermée ne pouvait exister de façon exclusive mais était toujours présente en équilibre avec la forme ouverte, même dans un solvant fortement polaire et protique comme le méthanol (Figure 2.10). Ceci peut être expliqué par la nature hydrophobe des chaînes latérales pouvant interagir entre elles, forçant ainsi les deux groupements responsables de l'interaction NCO à se séparer. De plus, les valeurs obtenues pour les différents composés synthétisés reflétèrent que l'activité inhibitrice était probablement due aux chaînes latérales et non au noyau de l'inhibiteur.

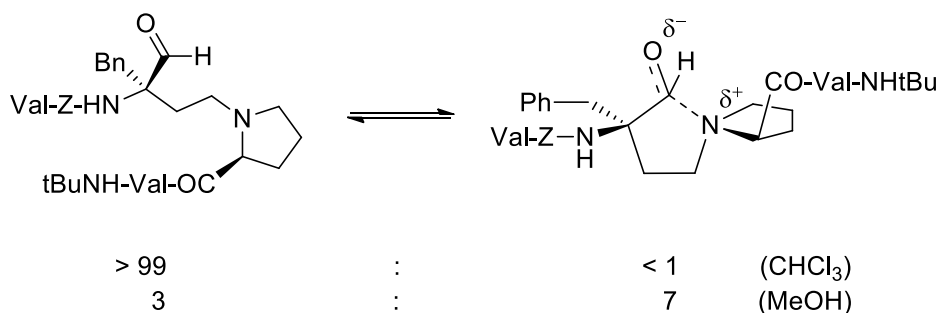


Figure 2.10. Equilibre conformationnel du meilleur inhibiteur de première génération.

Afin de s'affranchir du mélange de la forme ouverte et de la forme fermée, il fut décidé de changer de noyau et de se baser sur la technique des petites molécules avec une conformation bloquée (comme Indinavir et DMP450), travail effectué par Michael Waibel.<sup>7,87,88</sup> Il fut décidé d'utiliser un noyau urée beaucoup plus rigide et permettant une cyclisation énergétiquement moins coûteuse. Les études RMN montrèrent cette fois un repliement complet lors du passage en milieu protique polaire. Les tests d'inhibition enzymatique permirent d'isoler un bon candidat (*hit* ou *lead*) ayant une activité inhibitrice de l'ordre de 30  $\mu$ M. (Figure 2.11)

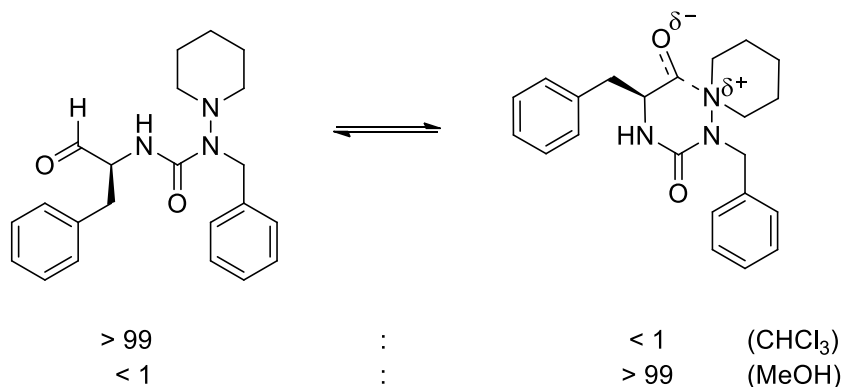


Figure 2.11. Equilibre conformationnel du meilleur inhibiteur de deuxième génération.

Le repliement est un processus qui se suit très bien par RMN (Figure 2.12). Une fois le composé dissous dans le MeOH- $d_4$ , un spectre est réalisé à différents intervalles de temps jusqu'à sa stabilisation. Le suivi du proton aldéhydique permet de se rendre compte de la proportion de forme ouverte et de forme fermée ainsi que de la cinétique de repliement.

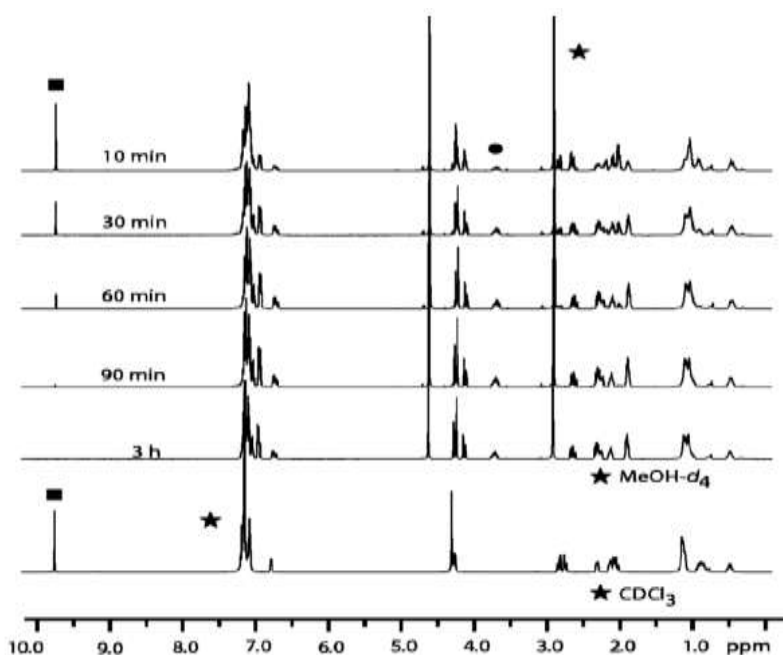


Figure 2.12. Suivi cinétique du processus de repliement par RMN.





## Chapitre 3. Développement d'une synthèse modulaire : vers une bibliothèque d'inhibiteurs

### 1. Objectif du projet

En chimie thérapeutique et plus précisément dans le design d'inhibiteur, une fois un *hit* obtenu, il est intéressant d'avoir une voie de synthèse la plus modulable possible afin de pouvoir préparer un grand nombre de dérivés de ce *hit* le plus rapidement et le plus efficacement possible. A la suite des travaux de thèse de Waibel et Gautier, une première petite molécule de choix a été retenue (**W**,  $K_i = 30 \mu\text{M}$ ) comme inhibiteur de la protéase VIH-1 de référence.<sup>86,87</sup> L'objectif de cette étude a été de développer une synthèse modulaire efficace et rapide vers des dérivés de la molécule de Waibel (Figure 3.1).

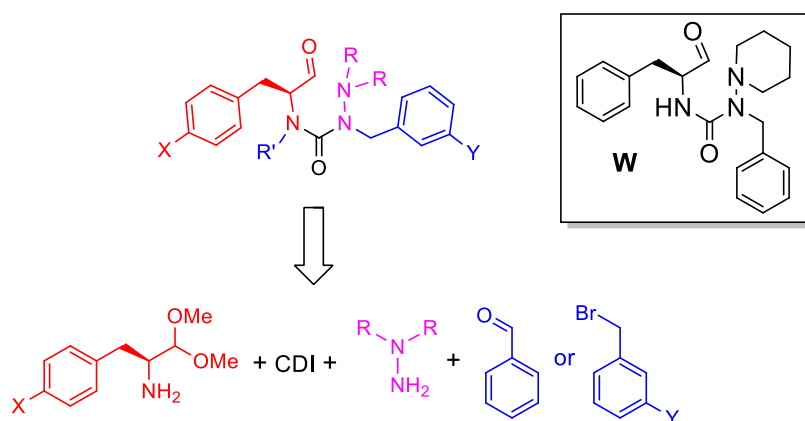


Figure 3.1. Approche rétrosynthétique modulaire de dérivés de la molécule **W**.

Pour cela, il a tout d'abord fallu améliorer la synthèse des acétals d' $\alpha$ -aminoaldéhydes afin de pouvoir les produire à plus grande échelle et à moindre coût sans modifier l'énantiopureté de l'objet en question. En effet, Waibel a démontré lors de ses travaux que les deux énantiomères montrent des constantes d'inhibition différentes vis-à-vis de la protéase HIV-1. Cependant la synthèse proposée par Waibel débute par une oxydation de Swern d' $\alpha$ -aminoalcool commercialement disponible présentant

plusieurs problèmes. D'une part, peu d' $\alpha$ -aminoalcools sont disponibles et ils sont généralement chers et d'autre part, les oxydations de Swern sont difficiles à réaliser à grande échelle (sans parler des désagréments olfactifs).

La molécule cible possède un centre urée, qui peut donc potentiellement être substitué quatre fois. Un des substituants est un dérivé d'acide aminé, un deuxième est une hydrazine et un troisième est un groupement benzyle. Jusqu'à présent, seuls trois substituants pouvaient être introduits. Il a donc semblé judicieux d'essayer d'attacher un quatrième substituant sur l'urée pour pouvoir apporter plus de diversité de cibles.

Une hypothèse quant à la faiblesse de la constante d'inhibition envers la protéase VIH-1 est que la molécule cible ne présente qu'un seul groupement capable d'interagir avec les résidus aspartiques par liaisons hydrogènes ou par interaction coulombienne. En étudiant de plus près le deuxième état de transition de la peptidolyse, on peut remarquer qu'il présente un pseudo groupement diol géminé. Il peut donc être judicieux d'introduire un groupement hydroxyle proche de l'interaction *NCO*. Le motif le plus simple, a priori, est une hydroxycétone à introduire à la place de l'aldéhyde.

Et finalement, il est nécessaire de vérifier que tous les composés synthétisés se comportent comme attendu, avec une cyclisation complète, et d'en évaluer le pouvoir d'inhibition envers la protéase VIH-1.

En résumé, les objectifs de cette première partie de thèse étaient :

- d'améliorer l'approche synthétique de l'inhibiteur de référence ;
- de développer une synthèse modulaire permettant de modifier simplement chacun des groupements indépendamment les uns des autres afin de pouvoir un jour avoir accès à une grande bibliothèque de molécules ;
- d'introduire un quatrième substituant sur l'urée ;
- de parvenir à incorporer un motif hydroxycétone à la place de l'aldéhyde ;
- d'étudier le repliement des molécules synthétisées et d'en évaluer le pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la protéase VIH-1.

## 2. Résultats de synthèse

### 2.1. Modifications apportées à la synthèse de Waibel

Les acides aminés et leurs dérivés sont très utilisés en chimie organique chirale du fait de leur faible coût. De nombreuses équipes se sont penchées sur l'obtention d'amino-aldéhydes énantio-purs à partir de leur acide aminé correspondant.<sup>89,90</sup> La plupart des méthodes décrites procèdent en deux temps avec une réduction préalable vers l'amino-alcool puis une oxydation ménagée, avec par exemple l'oxydation de Swern. C'est donc tout naturellement que le précurseur amino aldéhyde était préparé en se procurant l'amino-alcool et en l'oxydant par une réaction de Swern. Cependant dès que l'on veut travailler sur de grandes quantités et d'autres acides aminés, cela devient vite impraticable, cher, et certains amino-alcools ne sont tout simplement pas disponibles. Nous nous sommes alors tournés vers une méthode moins courante qui consiste à effectuer une réduction ménagée sur l'ester aminé correspondant à l'aide de DIBAL-H à -78 °C.<sup>91</sup> Cette réaction permet ainsi de réaliser des réductions contrôlées, faciles à réaliser, très propres (pas de purification par chromatographie nécessaire) et à partir de composés plus aisément disponibles et moins onéreux. L'amino-acétal **I-5** peut être ainsi synthétisé à l'échelle de la dizaine de gramme en 4 étapes avec 77 % de rendement (Figure 3.2).

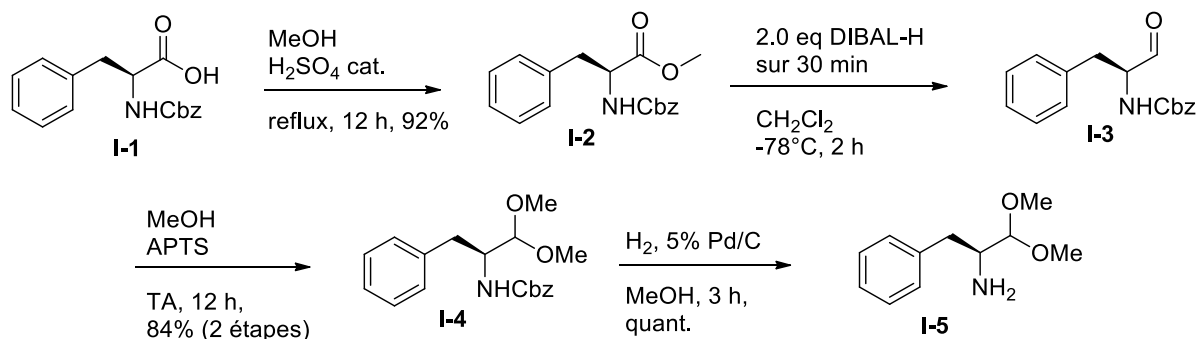


Figure 3.2. Synthèse du précurseur amino-acétal **I-5** à partir de la **N-Cbz-L-Phe**.

La suite de la synthèse n'a pas été modifiée puisqu'elle permettait déjà d'obtenir une large gamme de composés avec des rendements plutôt satisfaisants (Figure 3.3). L'hydrazine **I-7** est produite grâce à une amination réductrice à partir du benzaldéhyde et de la 1-aminopipéridine. La formation de l'urée se fait par couplage des deux amines grâce au CDI (1,1'-carbonyldiimidazole) après activation de l'intermédiaire. L'activation de l'intermédiaire imidazole est utilisée pour augmenter la réactivité et les rendements des réactions de couplage.<sup>92</sup> Ici, l'intermédiaire imidazolium est formé par traitement avec un excès d'iodure de méthyle qui est ensuite évaporé avant ajout de la seconde amine.

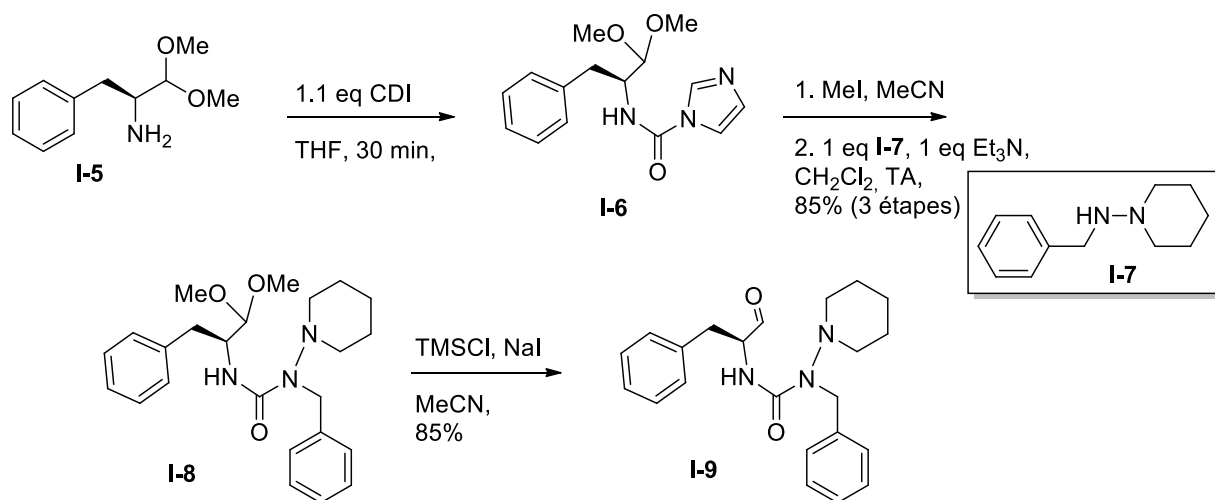


Figure 3.3. Synthèse du composé de Waibel à partir du précurseur amino-acétal I-5.

Il suffit ensuite de déprotéger l'acétal en condition anhydre afin d'éviter toute racémisation de l'aldéhyde. L'utilisation de TMSI généré *in situ* permet ainsi d'obtenir le composé de référence avec un rendement global de 55%.<sup>93</sup>

## 2.2. Modification de la partie acide aminé

### 2.2.1 A partir de la tyrosine

La première modification envisagée a porté sur la partie acide aminé. On a choisi de partir de la tyrosine, puisque c'est un composé naturel et commercialement disponible. Cela permet également de ne pas trop changer la structure de la cible et de faire la preuve conceptuelle que l'on peut synthétiser des dérivés d'inhibiteur en modifiant les substituants du cycle aromatique. L'utilisation d'un tel acide aminé n'est possible que grâce à la nouvelle voie de synthèse, puisque le tyrosinol n'est par exemple pas disponible à coût raisonnable et qu'il pose des problèmes de protection sélective. Nous avons donc dans un premier temps formé l'ester à partir de la *N*-Cbz-L-tyrosine puis protégé l'alcool phénolique par un éther silylé afin de le rendre inerte aux conditions de la réduction contrôlée (Figure 3.4). L'aldéhyde est donc obtenu de la même manière que précédemment par usage de DIBAL-H à -78 °C et directement engagé dans l'étape d'acétalisation afin de minimiser le risque de racémisation. Cependant les conditions d'acétalisation clivent l'éther silylé qui a donc dû être ré-introduit par la suite afin de rendre l'alcool phénolique inerte vis-à-vis du couplage. Le groupement protecteur Cbz est ensuite facilement ôté par hydrogénélyse catalysée par le palladium.



1.1 eq CDI  
 THF, 30 min  
 1. MeI, MeCN  
 2. 1 eq **1-7**, 1 eq Et<sub>3</sub>N,  
 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, TA, 82% (3 étapes)  
 TMSCl, NaI  
 MeCN, 59%  
 TBAF 2.5 eq  
 THF, TA, 10 min, **1-18** : R = TBS  
**1-19** : R = H  
 quant.

**Figure 3.5. Synthèse du premier dérivé I-20 à partir du précurseur amino-acétal I-16.**

### 2.2.2 Paranitrophénylalanine

Dans le but d'élargir encore le champ des substituants sur le noyau aromatique de la partie acide aminé, il fut décidé d'essayer d'introduire un groupement amine sur le noyau aromatique et d'y greffer un bras acétamide dans un premier temps. Afin de ne pas être gêné par l'amine et par *screening* des molécules commercialement disponibles, un dérivé paranitrophénylalanine fut choisi. De par la présence du groupement nitro, l'utilisation du groupement protecteur Cbz n'est pas compatible puisque ses conditions de clivage pourraient réduire la fonction nitro. D'autre part la présence d'un acétal empêche l'utilisation de conditions acides nécessaire au clivage des groupements Boc. Il fut donc choisi de protéger l'amine par un groupement Fmoc. Le dérivé Fmoc n'étant pas commercialement disponible, il est formé par réaction du chloroformate respectif avec l'amine **I-22** (Figure 3.6). Une fois l'acide aminé N-protégé obtenu, son ester méthylique est formé afin de pouvoir procéder à la réduction contrôlée. Comme précédemment, l'aldéhyde n'est pas isolé et est protégé directement afin de réduire le risque de racémisation. Le groupement Fmoc est finalement enlevé par traitement avec un excès de pipéridine afin d'obtenir le précurseur amino-acétal **I-26**.

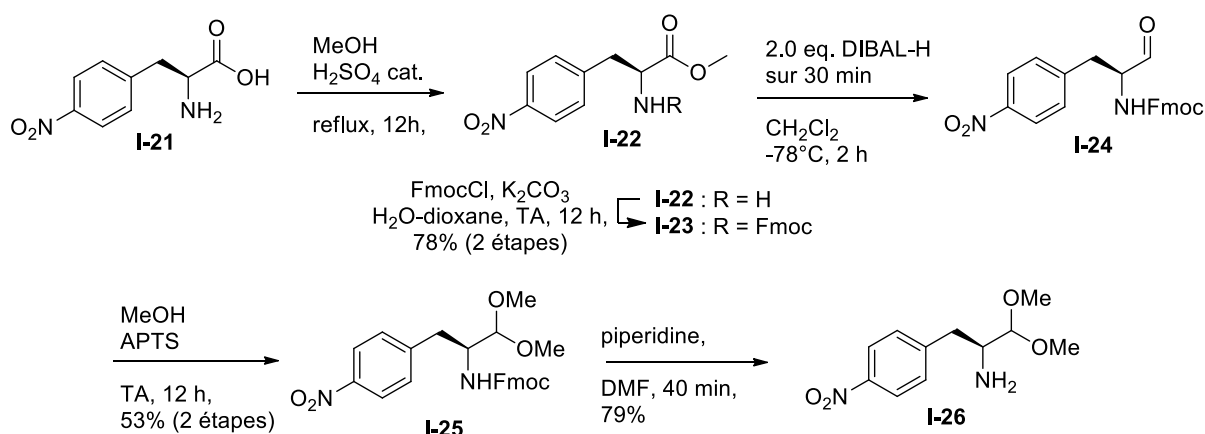


Figure 3.6. Synthèse du précurseur amino-acétal **I-26** à partir de la *p*-NO<sub>2</sub>-L-Phe.

Les deux étapes suivantes permettent de réaliser la formation de l'urée **I-28** (Figure 3.7). Il s'agit maintenant de réduire le groupement nitro. Cela a été effectué par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (5 % Degussa Type) avec un rendement quantitatif et sans purification par chromatographie nécessaire. L'acétamide est ensuite formé par couplage de l'amine et d'anhydride acétique en présence de triéthylamine. Et la déprotection finale de l'acétal permet d'obtenir le deuxième dérivé **I-31** avec un rendement global de 12 % en 11 étapes.

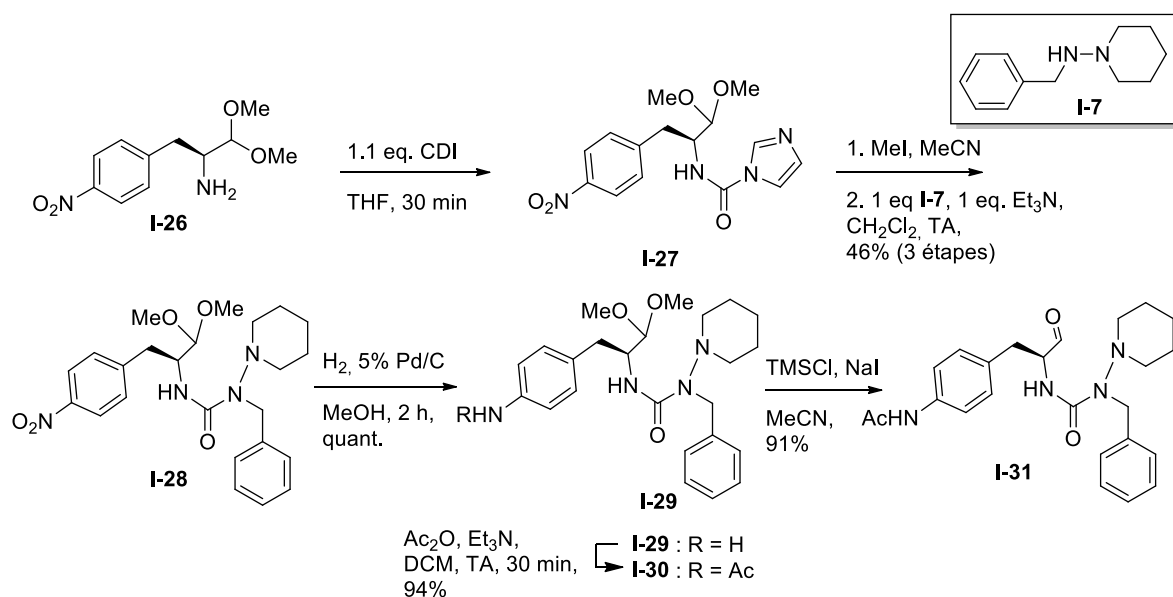


Figure 3.7. Synthèse du deuxième dérivé **I-31** à partir du précurseur amino-acétal **I-26**.

Nous avons également voulu voir s'il était vraiment nécessaire de fonctionnaliser l'amine aromatique. Nous avons donc tenté de déprotéger l'acétal **I-29** et nous avons constaté une dégradation du produit, probablement par réaction de l'aldéhyde libre avec l'amine aromatique. Il est donc nécessaire de fonctionnaliser cette position au préalable.

### 2.2.3 Modification de l'hydrazine

Une fois la modularité de la synthèse au niveau du noyau aromatique de la partie acide aminé prouvée, nous nous sommes intéressés à la partie hydrazine. Nous avons passé en revue les hydrazines commercialement disponibles et proches structuellement de la 1-aminopipérazine. La *N*-aminomorpholine a été choisie pour incorporer un hétéroatome dans le cycle carboné et la diméthylhydrazine a été retenue pour représenter une hydrazine sans cycle carboné. Pour le moment, nous avons choisi de ne pas nous intéresser au substituant benzyle. Les dérivés **I-32** et **I-35** ont été préparés conformément aux protocoles de la littérature, par amination réductrice.<sup>94,95</sup> Le couplage est ensuite réalisé à l'aide de CDI comme précédemment et la déprotection finale permet l'obtention de deux nouveaux dérivés **I-34** et **I-37** (Figure 3.8).



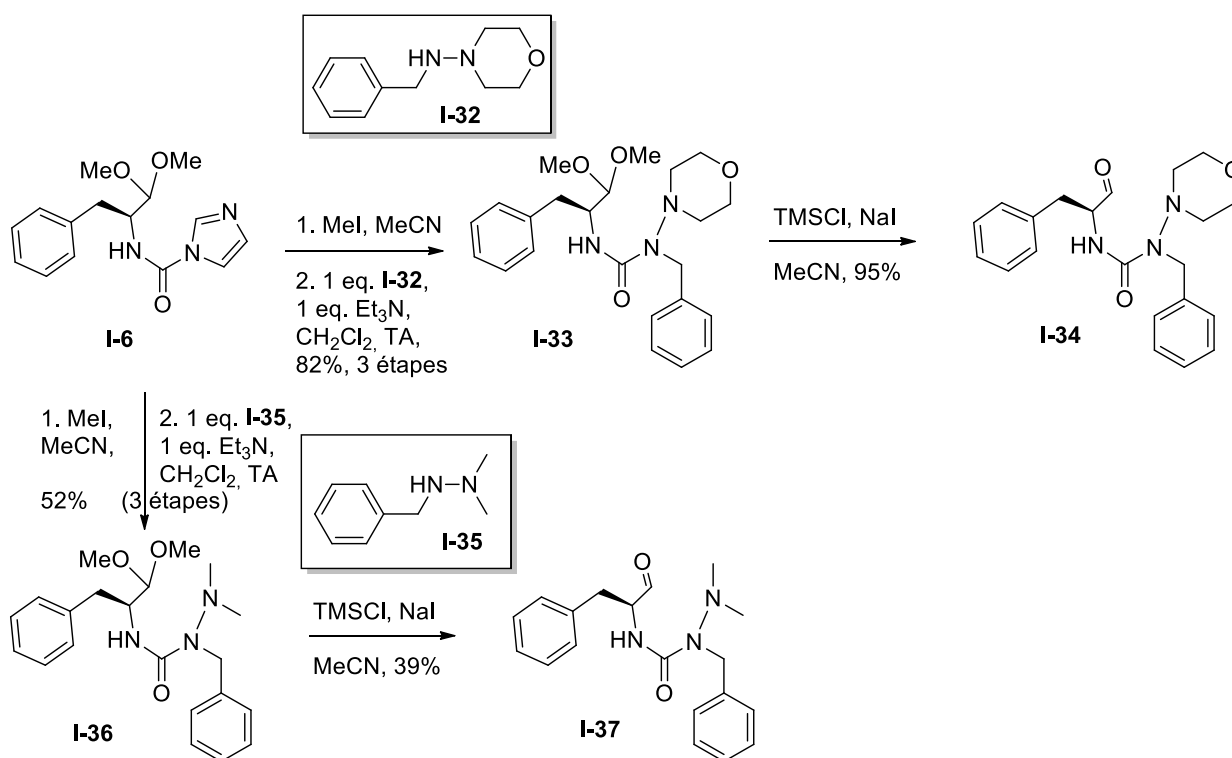


Figure 3.8. Synthèse des dérivés **I-34** et **I-37** comportant une moitié hydrazine différente.

Dans l'optique d'ouvrir la synthèse à des hydrazines non symétriquement substituées, nous pourrions envisager d'utiliser une technique développée au sein du laboratoire de chimie de l'ENS Lyon qui consiste à faire réagir une oxaziridine sur une amine secondaire dissymétrique.<sup>96</sup> Cette méthode permet d'obtenir des hydrazines protégées par un groupement Boc. Il suffirait ensuite de déprotéger l'hydrazine et de l'alkyler par amination réductrice (Figure 3.9).

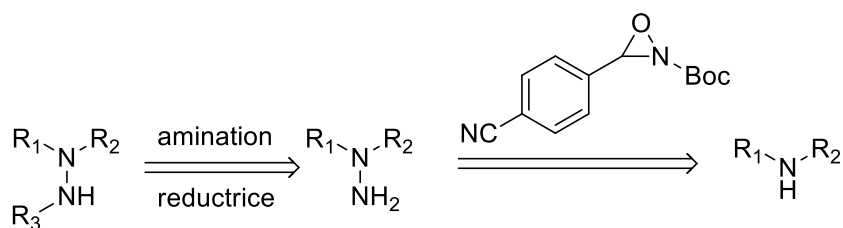


Figure 3.9. Voie d'obtention d'hydrazines dissymétriques.

Cette voie de synthèse n'a pas été explorée, mais pourrait aboutir à une nouvelle série de dérivés analogues présentant une meilleure affinité vis-à-vis des sous-poches enzymatiques.

### 2.2.4 Tétrastitution de l'urée et introduction de substituants

Si l'on observe dans le détail notre molécule de référence, on s'aperçoit qu'il reste une position de l'urée, où on pourrait rajouter un substituant afin de pouvoir éventuellement augmenter l'affinité de notre cible vis-à-vis de la protéase HIV-1. De plus si on compare notre cible à un inhibiteur connu, la DMP450, on perçoit une certaine similarité entre les deux structures (Figure 3.10). En substituant totalement l'urée, on espère également augmenter la préorganisation du motif afin d'assurer une cyclisation complète et rapide lors de la dissolution du composé dans un solvant polaire. Pour rappel, la molécule de référence se cyclise pour l'instant à 99 % environ en un peu plus de deux heures (dans le MeOH).

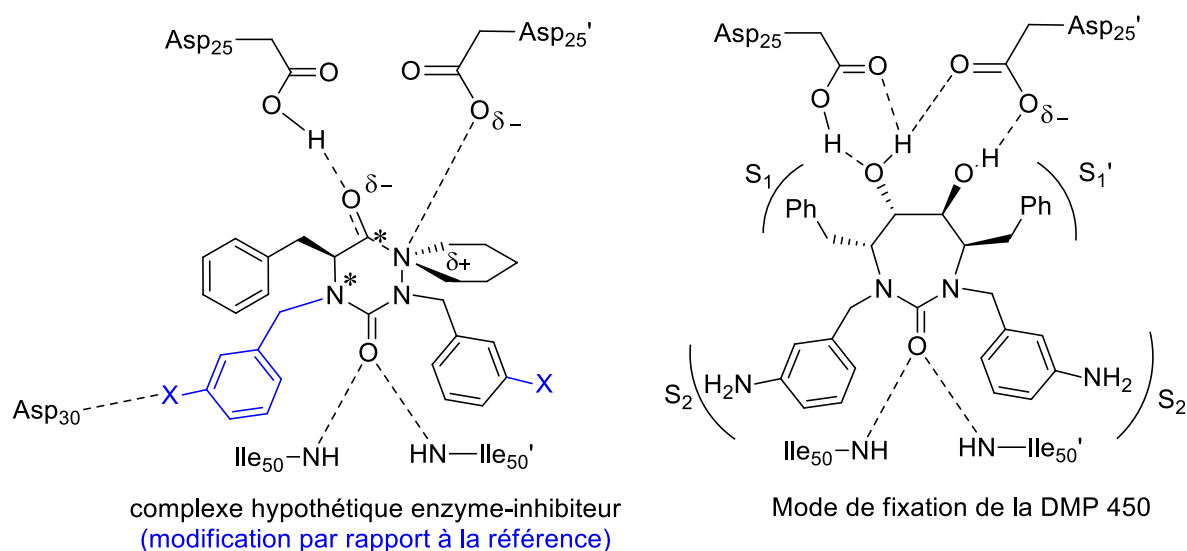


Figure 3.10. Comparaison du mode de complexation hypothétique de l'enzyme cible avec la structure de la DMP 450 et de la cible.

Lors de ses travaux de thèse, Waibel a tenté d'y parvenir en essayant de former le groupement urée à partir de deux amines secondaires. Il s'est d'abord révélé impossible de former l'intermédiaire réactionnel carbamoylimidazole **I-39** à partir de CDI/CDT avec une amine secondaire. En utilisant un réactif encore plus activé, le sel de diméthyl-CDI triflate, l'intermédiaire **I-40** fut obtenu mais malheureusement il ne réagit pas avec la deuxième amine secondaire (Figure 3.11).<sup>97</sup>

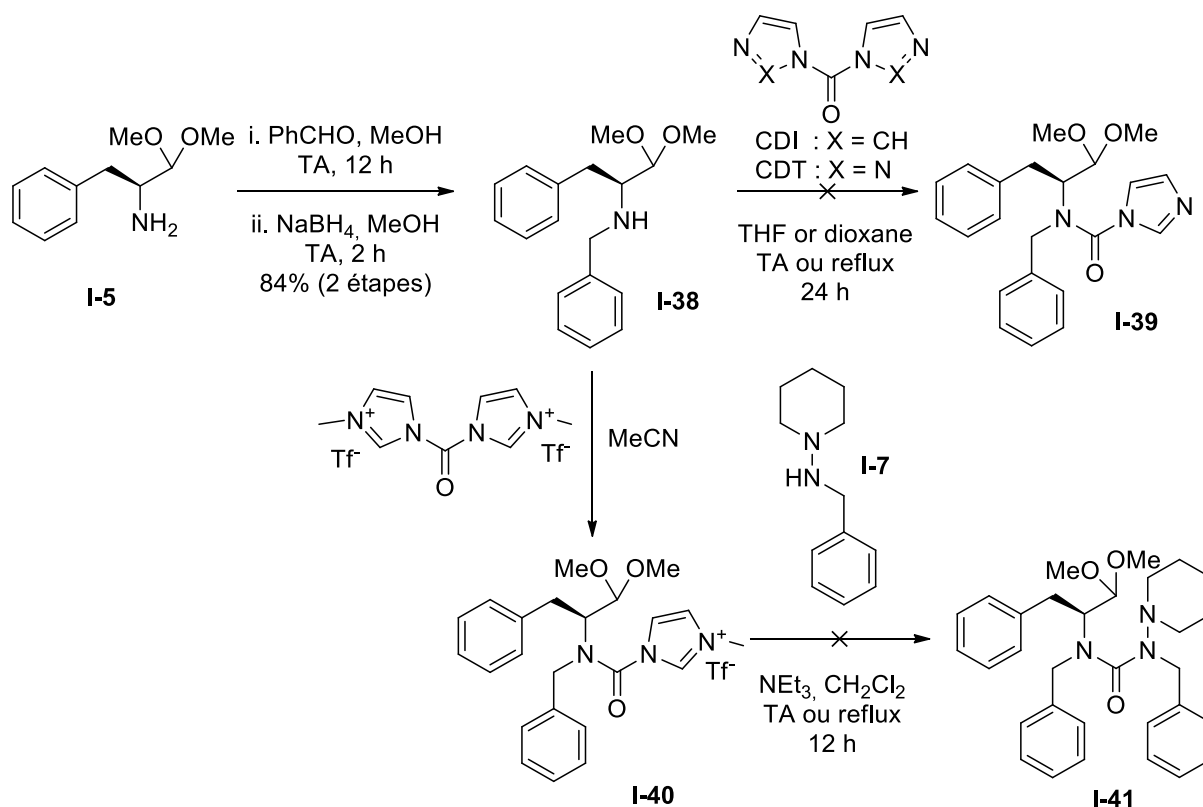


Figure 3.11. Première tentative pour accéder à une urée tétrasubstituée.

Dès lors, la substitution préalable à la formation de l'urée étant jugée impossible, nous avons choisi d'essayer de substituer l'urée après sa formation. Afin d'accéder le plus efficacement à des dérivés possédant des groupements identiques sur l'urée (analogie avec la DMP 450), nous avons choisi de partir de l'urée secondaire formée par couplage de l'amine **I-5** et de l'hydrazine commerciale grâce au CDI (Figure 3.12). Nous avons, dans un premier temps, optimisé la synthèse avec des groupements benzyliques non substitués. La substitution se réalise en présence de NaH dans le DMF afin de déprotoner l'urée pour l'activer et permettre la substitution nucléophile sur les différents dérivés halogénés. Il s'est avéré qu'un grand excès de base était nécessaire pour que la réaction ait lieu dans un délai raisonnable (2 jours) et, malgré cela, la réaction n'est jamais complète. Et si on laisse la réaction se poursuivre plus longtemps, on assiste à une baisse progressive des rendements, probablement due à une dégradation des produits et réactifs. On obtient toujours un mélange de produit mono-substitué et de produit disubstitué. Il est intéressant de noter que la substitution commence toujours par le côté hydrazine (augmentation du caractère nucléophile probablement lié à l'effet  $\alpha$  de l'hydrazine ; observation prouvée par RMN).

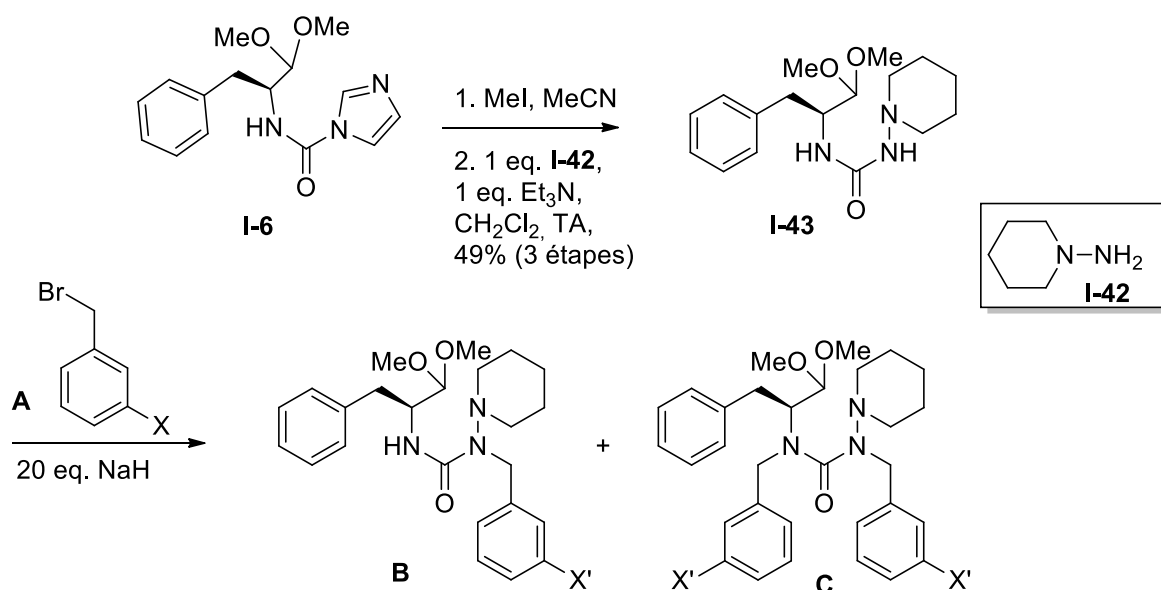
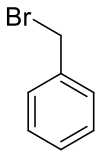
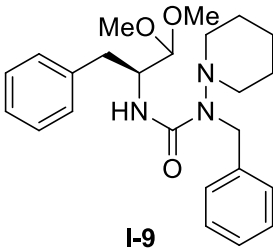
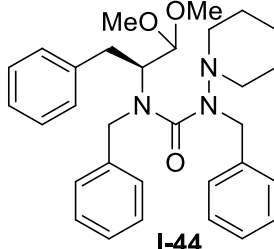
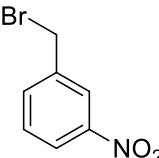
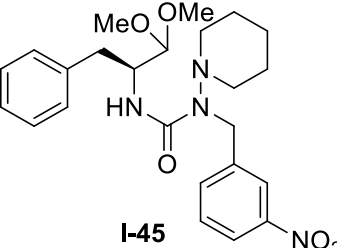
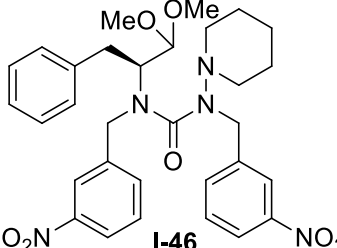
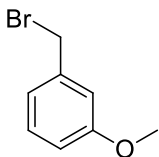
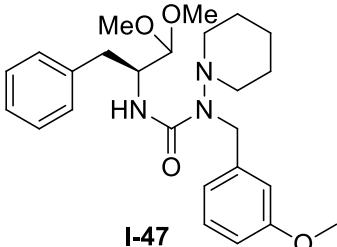
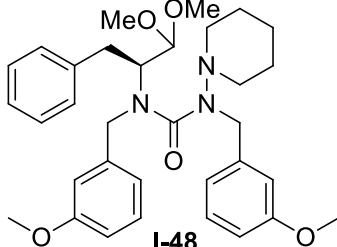
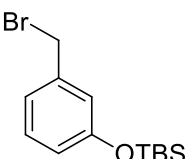
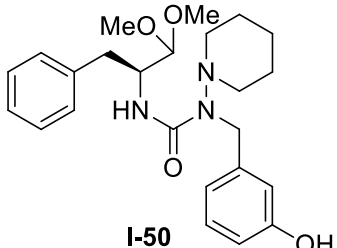
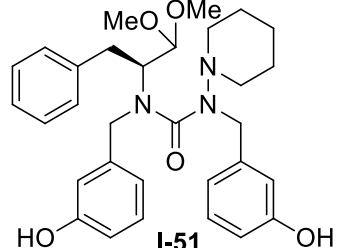


Figure 3.12. Substitution nucléophile de l'urée I-43.

Après avoir optimisé la synthèse avec le dérivé benzylique non substitué, nous avons essayé d'introduire des substituants sur le noyau benzylique. Nous nous sommes tout d'abord inspirés de la DMP 450 pour choisir les substituants et leur position. La première tentative a été d'essayer d'introduire un groupement nitro en méta pour ensuite la réduire en amine. Malheureusement dès l'addition du bromure de *m*-nitrobenzyle, le mélange réactionnel noircit et aucun produit ni réactif ne peut être isolé. Les dérivés aromatiques portant un groupement nitro étant connus pour former des radicaux sous certaines conditions, nous avons supposé que l'initiation radicalaire devait se faire de manière photochimique.<sup>98</sup> Et effectivement la réaction lancée à l'abri de la lumière ne noircit pas. Malheureusement lors de la vérification, on initie la réaction et le milieu devient noir dans la minute qui suit. Par analyse par spectroscopie de masse, nous avons été en mesure de voir des traces du produit de mono-substitution.

Afin de s'affranchir de ce problème, nous avons décidé de remplacer le groupement amine final par un groupement hydroxyl. Nous avons dans un premier temps, utilisé le dérivé méthoxy commercialement disponible, puis synthétisé le dérivé avec l'hydroxyl **I-49** protégé par un groupement éther de silyle suivant un protocole de la littérature.<sup>99</sup> Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 3.1. Dans le cas de l'éther silylé, il s'est avéré que le traitement aqueux pour neutraliser le milieu réactionnel le clivait également, ce qui nous permet de gagner une étape, puisque la déprotection était la prochaine réaction prévue originalement.

Tableau 3.1. Différents produits obtenus par alkylation de l'urée secondaire 41.

Réactif A	Produit B	rdt	Produit C	rdt
	 <b>I-9</b>	35 %	 <b>I-44</b>	12 %
	 <b>I-45</b>	trace	 <b>I-46</b>	0 %
	 <b>I-47</b>	48 %	 <b>I-48</b>	23 %
 <b>I-49</b>	 <b>I-50</b>	46 %	 <b>I-51</b>	8 %

Cette méthode nous a permis d'isoler pour la première fois des dérivés urées tétrasubstitués avec des rendements corrects. Les composés ainsi obtenus ont été déprotégés par la même méthode qu'utilisée précédemment, à savoir la génération de TMSI *in situ* (Figure 3.13). A notre grande surprise, seuls les dérivés tri-substitués se sont bien déprotégés et les rendements pour les dérivés tétra-substitués ont été quasi-nuls. En effectuant un suivi par spectroscopie de masse, nous nous sommes rendus à l'évidence que la réaction passe par un stade intermédiaire avec un seul méthoxy de clivé et l'hypothèse est que cet intermédiaire est plus stabilisé lorsque l'urée est exhaustivement substituée.

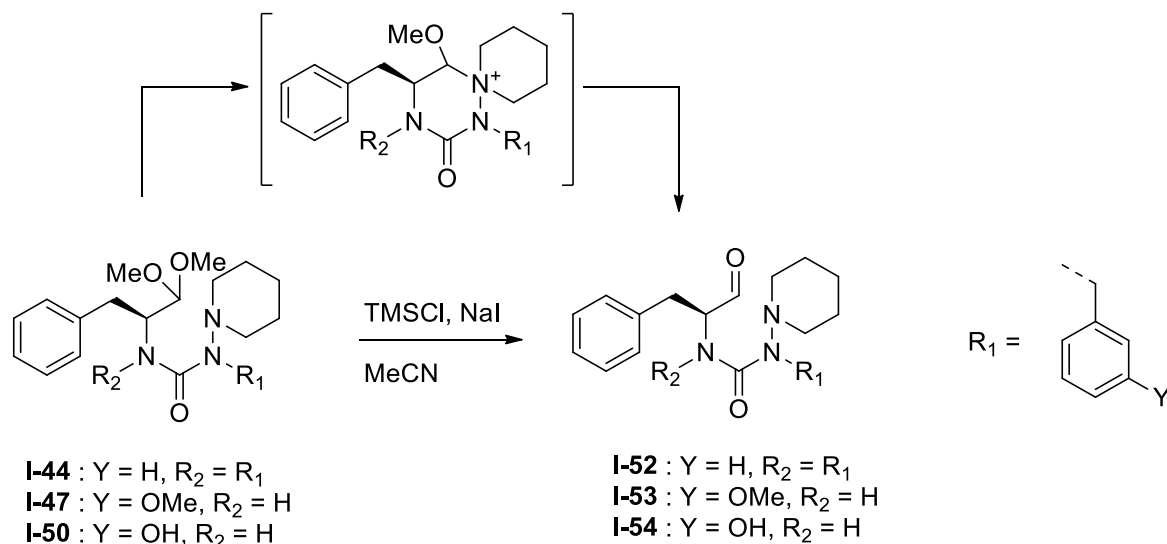


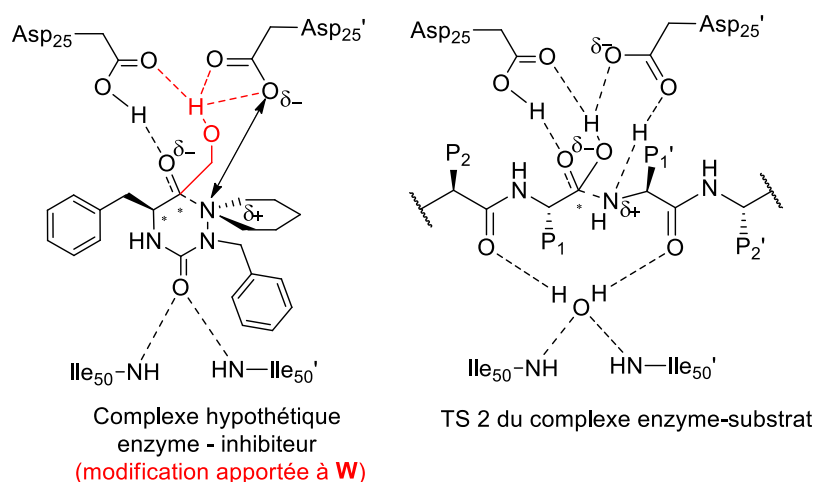
Figure 3.13. Etape de déprotection et hypothétique structure d'un intermédiaire réactionnel.

L'existence de cet intermédiaire tend à confirmer l'hypothèse que la substitution exhaustive renforce la pré-organisation du cycle et pourrait permettre une cyclisation quasi-totale lors de l'interaction *NCO*. La deuxième étape de la réaction peut être réalisée en effectuant une longue hydrolyse à pH neutre afin de s'affranchir encore une fois de la racémisation du centre chiral.

On a donc prouvé qu'on peut substituer l'urée sur les quatre positions. On pourrait également introduire 4 groupements différents puisque l'alkylation est sélective pour le côté hydrazine ou en partant directement d'une urée tertiaire.

### 2.2.5 Tentatives d'obtention d'hydroxy-cétones

Si on revient à l'analyse de l'état de transition qu'on souhaite mimer, on se rend compte que les résidus d'acides aspartiques peuvent interagir par jusqu'à 3 ou 4 liaisons hydrogènes avec l'état de transition et que si on s'intéresse à notre inhibiteur de référence, il ne peut y avoir qu'une ou deux liaison H plus une interaction coulombienne (Figure 3.14). Il pourrait donc être judicieux de rajouter dans la proximité directe du carbonyle un groupement capable d'interagir avec les résidus aspartiques par liaison H tout en restant inerte.



**Figure 3.14. Comparaison du mode de complexation hypothétique de la protéase avec la cible et de l'état de transition de la peptidolyse**

On ne peut bien évidemment rien rajouter sur le carbonyle sinon on affecterait l'interaction *NCO*. La meilleure option aurait été d'avoir un motif acide carboxylique, mais on aurait alors eu une construction sous forme de bétaine et non sous forme d'interaction *NCO*. On pourrait donc ajouter un groupement hydroxyle en  $\alpha$  du carbonyle pour garder la proximité avec les résidus aspartiques afin d'avoir deux groupements capables d'interagir par liaison. La seule option possible est de rajouter un carbone et de former une  $\alpha$ -hydroxy-cétone. Lors de l'interaction *NCO*, nous aurons donc une unité à mi-chemin entre une hydroxy-cétone et un diol vicinal, motif qu'on retrouve dans certains inhibiteurs comme la DMP 450 par exemple.

Les  $\alpha$ -hydroxy-cétones et les  $\alpha$ -hydroxy-aldéhydes ont fait l'objet de recherches intensives car ce sont des composés très utiles en synthèse et qui jouent un rôle important dans certains processus biologiques.<sup>100</sup> Il existe également un équilibre tautomérique entre ces deux formes, connu sous le nom d'équilibre de Lobry de Bruyn – Alberta van Ekenstein, et qui favorise la forme hydroxy-cétone.<sup>101</sup> Les hydroxy aldéhydes sont généralement produits par réduction des  $\alpha$ -hydroxy-cyanide correspondantes.<sup>102</sup> Outre la tautomérisation des  $\alpha$ -hydroxy-aldéhydes, il existe de nombreuses réactions permettant l'obtention d' $\alpha$ -hydroxy-cétones. Elles sont résumées dans la Figure 3.15.<sup>103-108</sup>

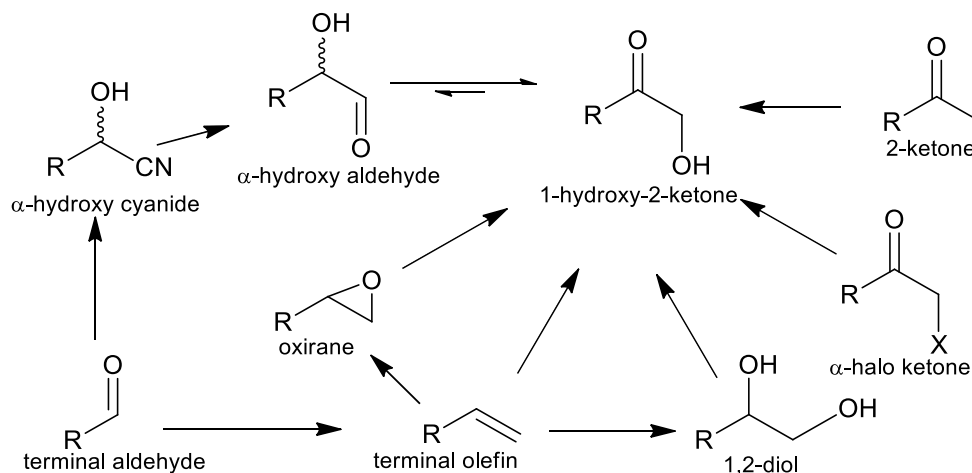
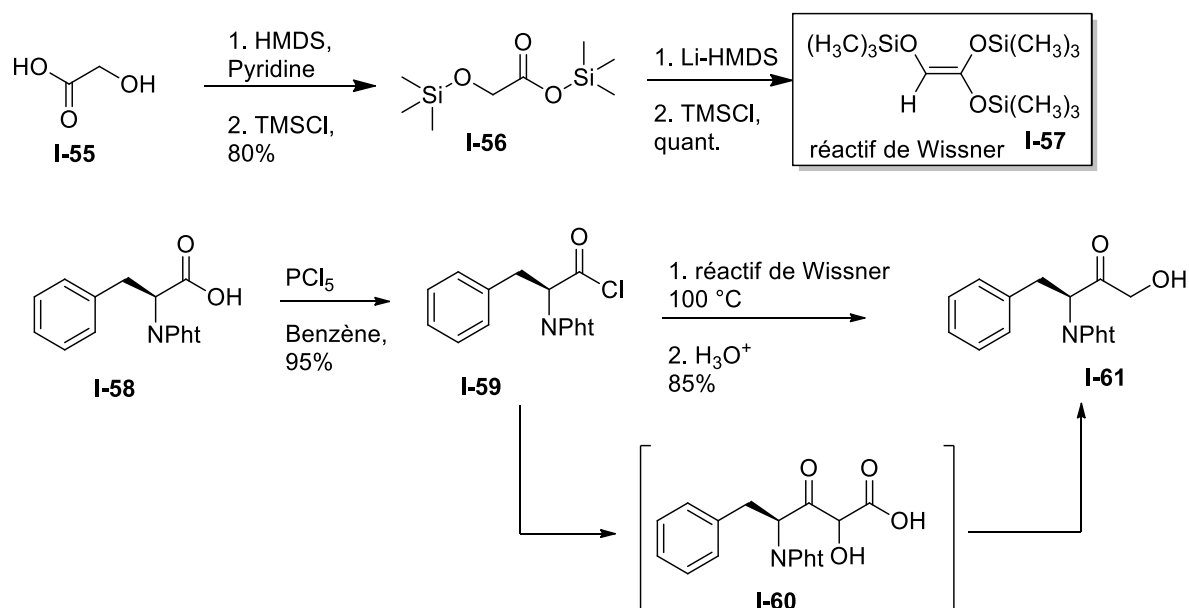


Figure 3.15. Survol de plusieurs précurseurs permettant la synthèse d' $\alpha$ -hydroxy-cétones.

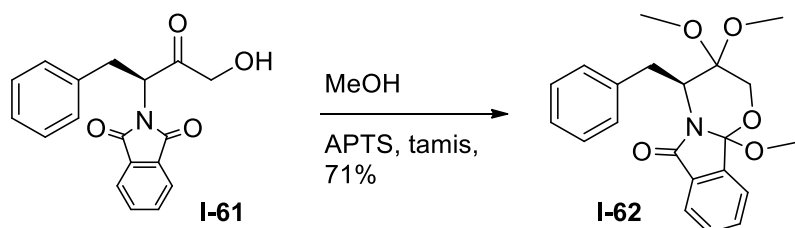
Lors de mon stage de Master, effectué avant de commencer cette thèse, j'ai exploré la synthèse d' $\alpha$ -hydroxy-cétone par plusieurs voies.<sup>109</sup> Nous sommes, dans un premier temps, parvenus à synthétiser le dérivé  $\alpha$ -hydroxy-cyanide à partir de la phénylalanine mais celui-ci s'est révélé impossible à réduire en  $\alpha$ -hydroxy-aldéhyde probablement du fait du fort encombrement stérique. Nous avons ensuite synthétisé l'oléfine terminale à partir de la phénylalanine, tâche assez ardue, pour ensuite essayer différentes voies d'oxydation contrôlée. Cependant aucune des tentatives n'a abouti et la plupart du temps, nous avons obtenu des mélanges de différents stades d'oxydation très difficiles à séparer par chromatographie.

Cette cible avait donc été mise de côté jusqu'au jour où, au détour d'une recherche bibliographique, j'ai découvert la réaction de Wissner dans un article de Parkes *et al* (Figure 3.16).<sup>110</sup> Cette réaction permet d'ajouter un carbone portant un groupement hydroxy à partir de n'importe quel chlorure d'acyle grâce à un réactif persilylé **I-57** qu'on appellera « réactif de Wissner ».<sup>111</sup> Celui-ci peut être obtenu en grande quantité à partir de l'acide glycolique. La réaction de Wissner ayant des conditions drastiques (réaction sans solvants chauffée à une centaine de degrés), l'amine se doit d'être protégée par un groupement très stable comme un phtalimide. On doit dans un premier temps obtenir le chlorure d'acyle **I-59** soit par réaction de  $PCl_5$  ou par  $SOCl_2$  et ensuite le mettre à réagir avec le réactif de Wissner. L'intermédiaire **I-60** n'est pas isolé et le produit final **I-61** est obtenu avec un rendement excellent de 90 % sur 2 étapes.



Figure 3.16. Obtention de l'  $\alpha$ -hydroxy-cétone **I-61** par la réaction de Wissner.

Une fois l'hydroxy-cétone obtenue, il s'agit de la protéger afin de la rendre inerte aux conditions des réactions suivantes. Il est également important de protéger rapidement la cétone pour éviter tout risque de racémisation. Il a donc été logique de procéder à l'acétalisation de cette dernière. La réaction se déroule de manière très propre mais lors de l'analyse RMN, nous nous sommes rendu compte qu'on a un groupement méthyl supplémentaire. A l'aide d'expérience RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC), on a pu reconstituer la structure du produit obtenu (Figure 3.17). On assiste à la formation d'un acétal amide due à la préorganisation intramoléculaire de l'hémi-acétal amide. Le produit **I-62** ainsi obtenu est inerte aux conditions de déprotection du phthalimide.

Figure 3.17. Acétalisation du composé **I-60**.

Il faut donc protéger le groupement hydroxyle avant de protéger le carbonyle. Cependant il est nécessaire de mettre un groupement protecteur ayant des conditions de déprotection orthogonale à celle de formation de l'acétal et celle de déprotection du phthalimide et ayant des conditions de protections ni trop acides ni trop basiques pour éviter toute racémisation. On ne peut donc pas utiliser les éthers silylés, puisqu'ils sont clivés lors des conditions d'acétalisation, on ne peut pas non plus utiliser les éthers puisqu'ils sont généralement introduits en conditions fortement basiques. Les esters peuvent être introduits de manière douce mais on est alors en conditions de clivage non orthogonales à

celles du phthalimide. On a cependant choisi cette solution en pensant reprotéger l'alcool obtenu avant l'étape de couplage par le CDI. Les esters benzyliques et acétiques ont été synthétisés avec succès mais l'acétalisation de ces derniers s'est révélée impossible (Figure 3.18).

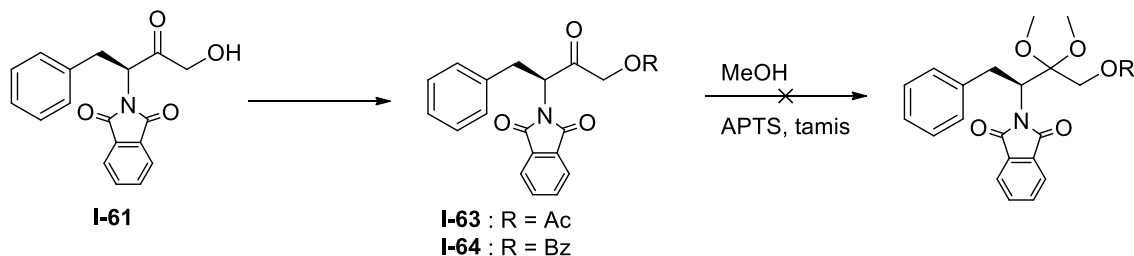


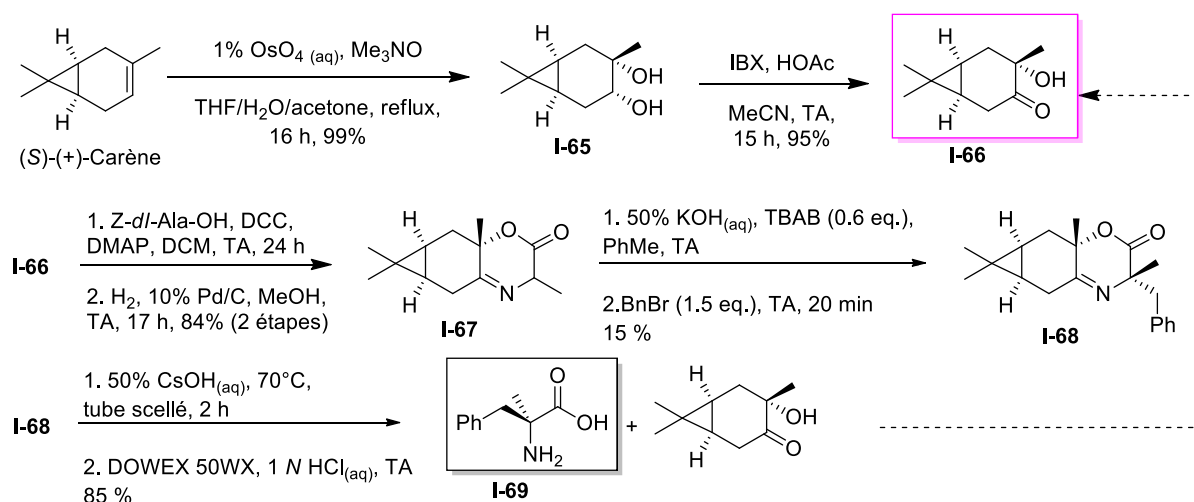
Figure 3.18. Tentatives de protection du motif hydroxy-cétone.

Nous avons donc enfin réussi à obtenir l'hydroxy-cétone voulue, mais malheureusement, par souci de temps et d'orientation de mes travaux, nous avons mis ce projet de côté. Il reste encore beaucoup de possibilités de protection/déprotection à tester et je suis convaincu qu'il est possible de trouver un motif de protection original pour l'hydroxy-cétone (sous forme d'imino-lactone par ex.).

## 2.2.6 Synthèse d' $\alpha$ -méthyle acide aminés

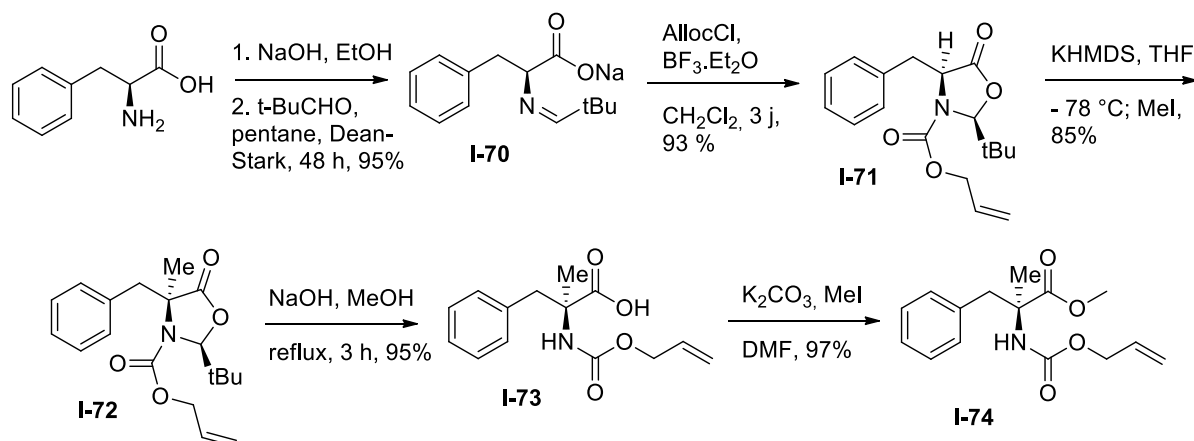
Dans les synthèses présentées précédemment, il est à chaque fois question de racémisation de la partie acide aminée. En effet, Waibel a synthétisé les deux énantiomères de plusieurs composés et montré qu'ils avaient des activités inhibitrices différentes. Nous avons supposé dans chacune des synthèses que la racémisation était négligeable. Nous aurions pu et dû, réaliser des analyses HPLC sur colonne chirale pour s'assurer de l'énantiopureté de nos échantillons. Afin de s'affranchir de ce problème, nous avons envisagé d'enlever le proton labile et de le remplacer par un groupement méthyle. Il nous faut donc commencer la synthèse par un  $\alpha$ -méthyle acide aminé. Malheureusement, ces molécules sont excessivement chères et il est donc préférable de les synthétiser soi-même. Plusieurs synthèses ont été développées dans les dernières années. Nous avons retenu deux synthèses qui présentent des bons rendements et un nombre d'étapes raisonnable.

La première, développée par le groupe de Lu, repose sur l'utilisation d'un auxiliaire chiral recyclable formé en deux étapes à partir d'un produit commercialement disponible, la (1*S*)-(+)-3-carène (Figure 3.19).<sup>112</sup> L' $\alpha$ -hydroxy-cétone **I-66** est ensuite couplée en deux étapes à l'alanine pour obtenir une iminoalactone qui présente une face très encombrée et qui réagit stéréosélectivement par substitution nucléophile pour donner le composé **I-68** avec une grande pureté énantiomérique. Il suffit ensuite d'hydrolyser l'imino-lactone pour fournir le composé d'intérêt et régénérer l' $\alpha$ -hydroxy-cétone.

Figure 3.19. Synth\u00e8se d' $\alpha$ -m\u00e9thyle ph\u00e9nylalanine par Lu.

Malheureusement pour nous, les rendements pour l'\u00e9tape d'alkylation se sont r\u00e9v\u00e9l\u00e9s tr\u00e8s d\u00e9cevants (15% contre les 90 % annonc\u00e9s) et seules quelques centaines de milligrammes de produits ont pu \u00eatre isol\u00e9es. Sachant qu'il reste une dizaine d'\u00e9tapes par la suite, nous avons d\u00e9cid\u00e9 d'explorer la seconde synth\u00e8se ayant retenu notre attention.

La deuxi\u00e8me synth\u00e8se, d\u00e9velopp\u00e9e par Page *et al.*, repose sur la chiralit\u00e9 de l'acide amin\u00e9 de d\u00e9part pour ensuite engendrer un interm\u00e9diaire lui-m\u00eame st\u00e9reo-orient\u00e9 pour favoriser une alkylation dirig\u00e9e.<sup>113</sup> Cet interm\u00e9diaire cis-oxazolidinone **I-71** peut alors \u00eatre alkyl\u00e9 de fa\u00e7on diast\u00e9r\u00e9os\u00e9lective avec un ratio sup\u00e9rieur \u00e0 20 : 1. Il suffit ensuite de cliver l'oxazolidinone pour obtenir l' $\alpha$ -m\u00e9thyl-acide amin\u00e9 d'int\u00e9r\u00eat.

Figure 3.20. Synth\u00e8se d' $\alpha$ -m\u00e9thyle ph\u00e9nylalanine par Page.

Malgr\u00e9 des temps de r\u00e9actions tr\u00e8s longs, il a \u00e9t\u00e9 possible de mener cette synth\u00e8se parall\u00e8lement au projet suivant et d'obtenir 4.5 g d' $\alpha$ -m\u00e9thyle-Phe **I-74** (rendement global de 69 %). Par soucis de temps, la synth\u00e8se de l'inhibiteur n'a pas \u00e9t\u00e9 poursuivie.

### 2.3 Conclusion et perspectives

On a donc réussi à atteindre une gamme de huit composés résumée ci-dessous (Figure 3.21) grâce à des améliorations de synthèses apportées à la synthèse développée par Waibel. Il est maintenant possible d'introduire des modifications sur la partie acide aminé, sur la partie hydrazine, sur le substituant de l'urée et d'introduire un quatrième substituant sur l'urée.

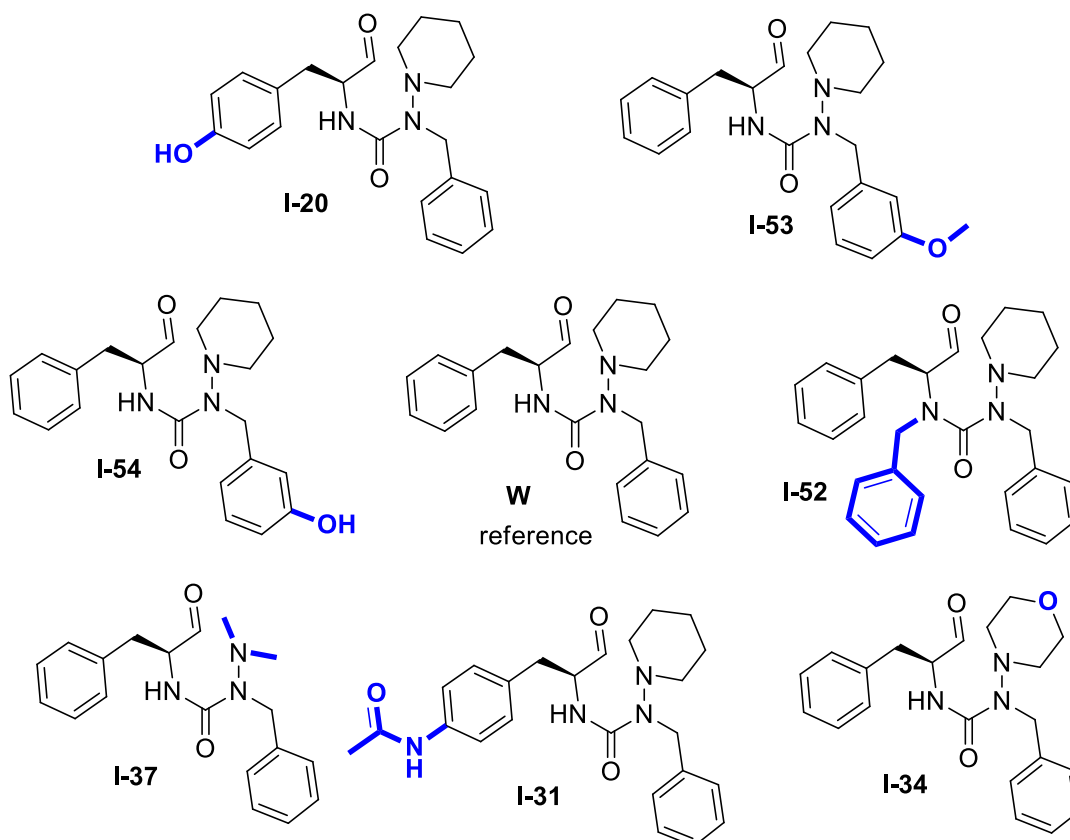


Figure 3.21. Résumé des molécules cibles atteintes

Du point de vue purement synthétique, il reste plusieurs objectifs à poursuivre :

- L'insertion d'un motif hydroxy-cétone à la place de l'aldéhyde. Un travail conséquent a été effectué et un précurseur portant la dite fonction a été isolé. La prochaine étape est de trouver un ou plusieurs groupements protecteurs pouvant protéger les deux fonctions et ainsi poursuivre la synthèse.
- La poursuite de la synthèse d'un inhibiteur comportant un site asymétrique bloqué du fait de l'utilisation d'un précurseur  $\alpha$ -méthyle acide aminé. Deux synthèses ont été explorées et l'une a permis l'obtention de 4.5 grammes  $\alpha$ -méthyle phénylalanine. Il reste « simplement » à poursuivre la synthèse.

- Pour les composés obtenus, il serait judicieux de contrôler la pureté énantiérique des échantillons car il a été montré par Waibel que les énantiomères ont des pouvoirs inhibiteurs différents.
- On pourrait également envisager d'introduire des hydrazines non symétriques ou des substituants différents sur l'urée.

Tous les composés obtenus ont été soumis à des tests de cyclisations suivis par RMN. Tous les composés obtenus se sont cyclisés en l'espace de quelques heures dans du MeOD- $d_4$ . Le suivi de cyclisation du composé I-20 est présenté ci-dessous (Figure 3.22).

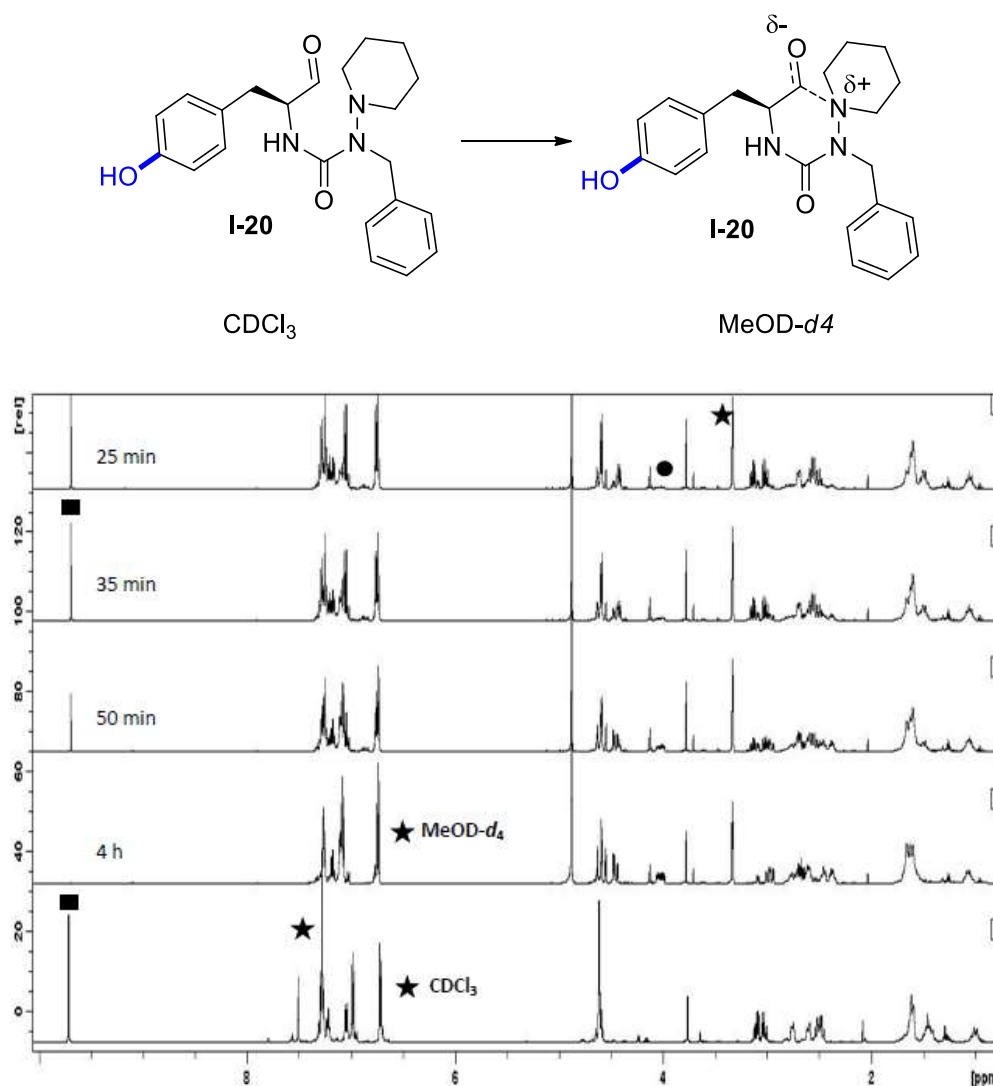


Figure 3.22.

On constate grâce au spectre dans le  $\text{CDCl}_3$ , qu'on a exclusivement la forme ouverte dans ce solvant et lorsqu'on dissout le composé dans le  $\text{MeOD-}d_4$ , on observe une diminution progressive de l'intensité du signal correspondant au proton aldéhydique et l'apparition d'un nouveau signal. On observe la cyclisation complète au bout de 4 h environ.

## Chapitre 4. Mesures biologiques

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Lorena Martinez, doctorante en biologie de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP) de Lyon sous la supervision du Pr. Pierre Falson. Une partie de sa thèse est dédiée à l'exploration de molécules pouvant à la fois inhiber la protéase VIH-1 et divers transporteurs transmembranaires.<sup>114</sup> Sept candidats inhibiteurs obtenus ont été testés par différentes méthodes pour déterminer leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la protéase VIH-1, leur toxicité, puis leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de 2 transporteurs membranaires P-gp et BCRP ainsi que leur tendance à être expulsés des cellules par ces derniers. Nous présenterons tout d'abord les résultats relatifs à notre étude, *i.e.* les tests d'inhibition enzymatique, puis nous décrirons synthétiquement les autres résultats biologiques.

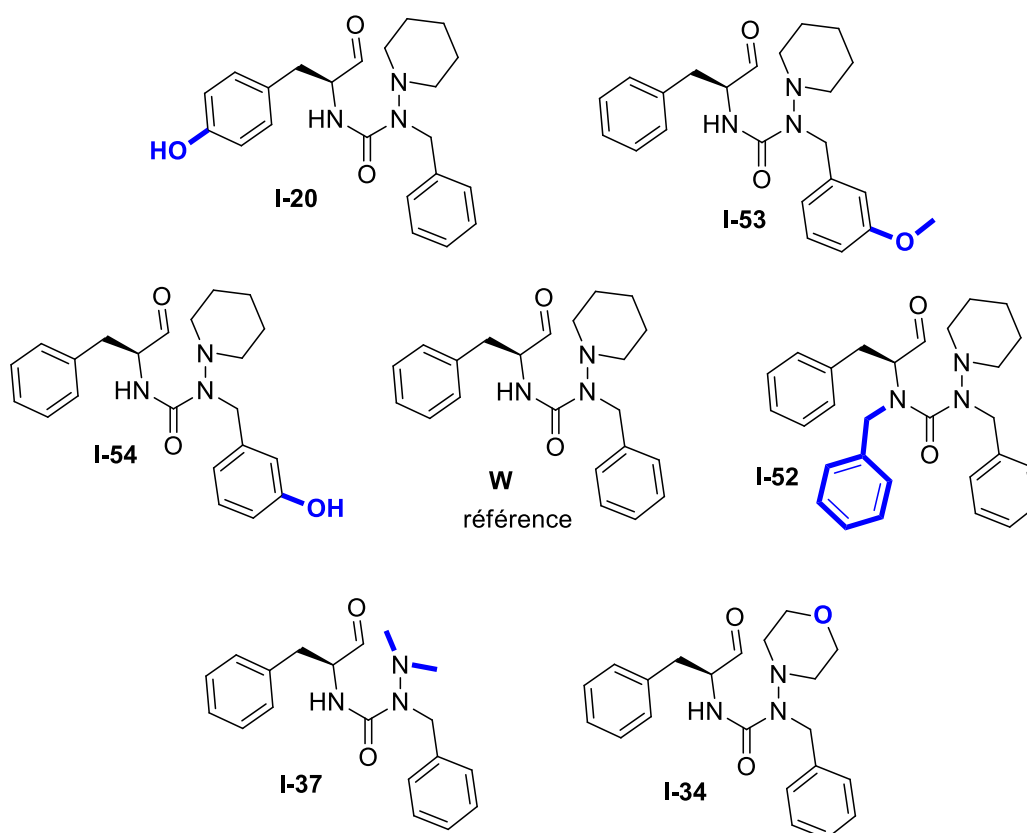


Figure 4.1. Rappel des candidats pour l'inhibition de la protéase du VIH-1

## 1. Inhibition vis-à-vis de la protéase VIH-1

Les tests d'inhibition ont tout d'abord été conduits par une nouvelle technique de test *in cellulo*, puis par une méthode plus classique utilisant la technologie FRET afin de comparer les résultats et de valider la première expérience.

### 1.1. Tests *in cellulo*

Cette méthode, mise au point par l'équipe de R. Wolkowicz, permet d'avoir une réponse fluorescente fonction de l'inhibition d'une molécule cible *in cellulo*.<sup>115,116</sup> Les cellules en question sont des lymphocytes T (cibles naturelles du VIH) dont le matériel génétique a été modifié pour y incorporer un système Gal4/PR/GFP qui comporte :

- des facteurs de transcription prototypique Gal4 (le domaine liant à l'ADN ou DBD pour *DNA-binding domain* et le domaine de trans-activation ou TAD pour *trans-activation domain*) entre lesquels a été insérée la séquence codant pour la protéase VIH-1 avec à ses deux extrémités des séquences reconnues par cette même protéase.
- une séquence permettant l'expression de la séquence produisant la GFP après reconnaissance du domaine liant de Gal4 (DBD) par une séquence définie (UAS pour *upstream activation sequence*) et l'activation par le domaine de trans-activation (TAD).
- un promoteur de l'expression du gène Gal4 (TRE pour *tetracycline-reponsive element*) par induction par la tétracycline ou par le biais d'un activateur induit par la doxycycline (rtTA pour *reverse tetracycline transactivator*).

Prenons tout d'abord le cas simple Gal4/GFP, où on n'aurait pas incorporé la séquence codant pour la protéase VIH-1 (cas A et B Figure 4.2). En absence de doxycycline, le gène Gal4 n'est pas exprimé et donc il ne peut y avoir production de GFP. Par contre en présence de doxycycline, le gène Gal4 (séquence DBD – TAD en bleu) est exprimé et produit une protéine possédant à la fois le domaine de reconnaissance et d'activation du promoteur de GFP qui induit à son tour l'expression du gène GFP et donc la production de GFP.

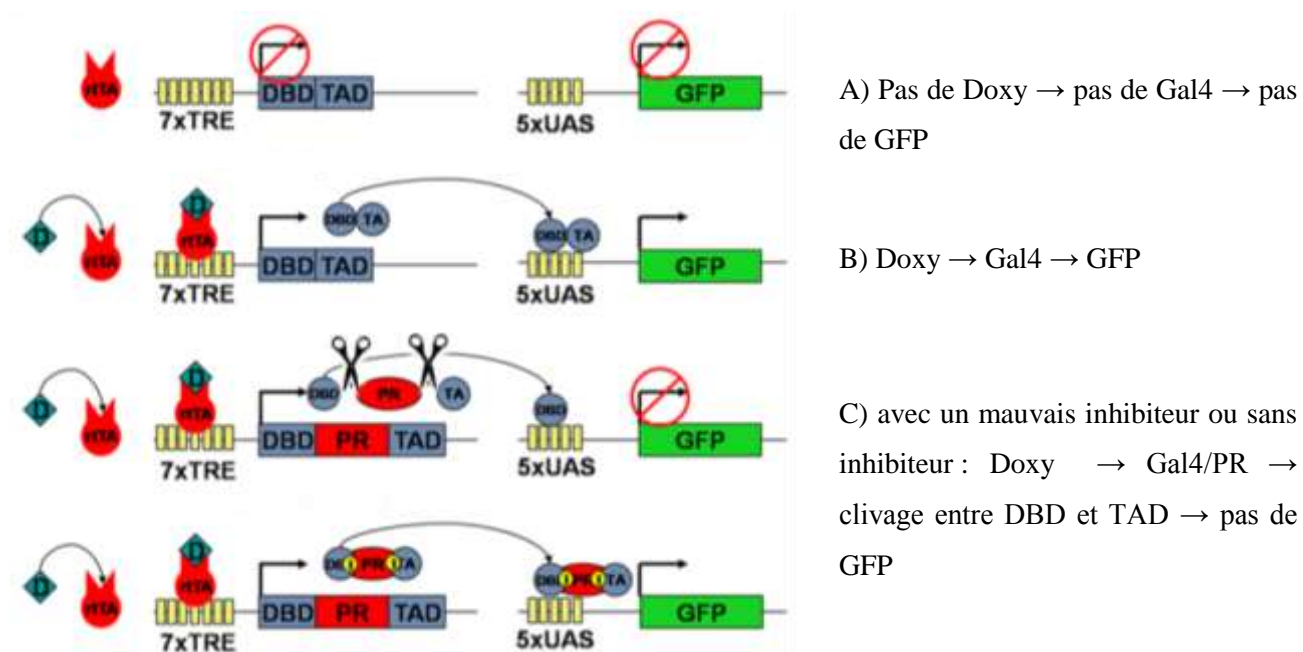


Figure 4.2. Biosenseur de l'activité de la protéase VIH-1. D ou Doxy : doxycycline ; I : inhibiteur.

Dans le cas du système Gal4/PR/GFP, on joue sur le fait que les domaines DBD et TAD doivent agir ensemble pour qu'il y ait expression du gène GFP (cas C et D de la Figure 4.2). Ainsi, en absence d'un inhibiteur de protéase HIV-1 ou en présence d'un mauvais inhibiteur et en présence de doxycycline, le gène Gal4/PR est exprimé mais l'activité autocatalytique de la protéase entraîne le clivage et la séparation des domaines DBD, TAD et PR. Le domaine TAD ne peut donc pas se lier au promoteur de la GFP et aucune GFP n'est produite. Dans le cas contraire, en présence d'un inhibiteur de la protéase VIH-1 et de doxycycline, le gène Gal4/PR est exprimé et produit les domaines TAD et DBD reliés entre eux par la protéase du VIH inhibé et ainsi peut se lier et activer le promoteur de GFP et ainsi produire de la GFP.

On peut donc quantifier l'inhibition en mesurant la production de GFP, mesure réalisée par cytométrie de flux (protocole et détails sur la cytométrie de flux en annexe p. 164). La fluorescence émise par les cellules après 2 jours d'incubation à des concentrations données d'inhibiteur permettent de calculer la concentration inhibitrice médiane ou  $IC_{50}$ . Les résultats sont présentés ci-dessous avec le Saquinavir et l'Indinavir comme référence (Figure 4.3).



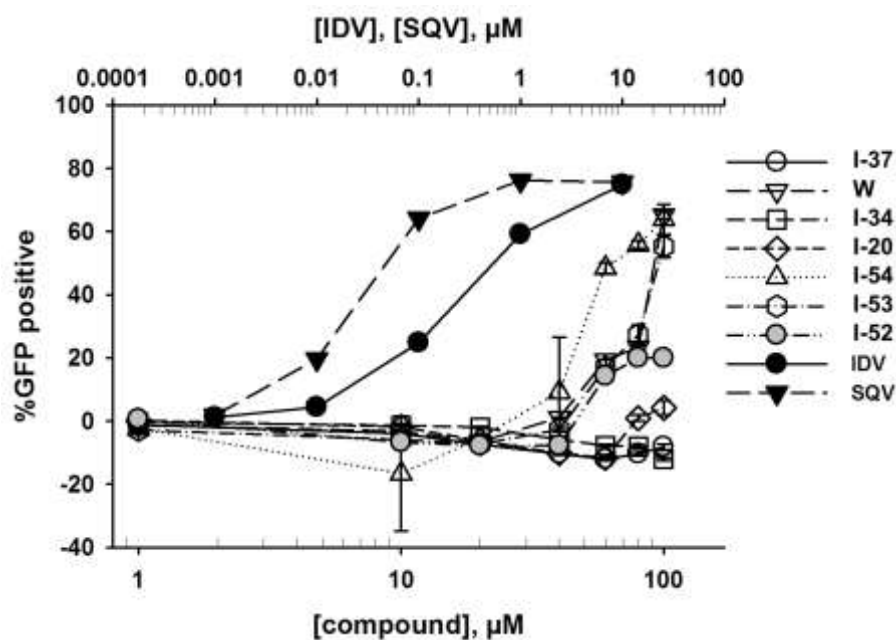


Figure 4.3. Fluorescence émise par les cellules incubées avec différentes concentrations d'inhibiteurs. En haut est présentée l'échelle pour la concentration des inhibiteurs de référence et en bas celle pour la concentration de nos composés.

On peut remarquer que les composés **W**, **I-53** et **I-54** montrent un comportement d'inhibiteur avec un  $IC_{50}$  supérieur à 20  $\mu M$  tandis que les autres candidats ne montrent pas d'activité inhibitrice notable.

## 1.2. Tests FRET

Afin de valider les résultats précédents, nous avons eu recours à la technologie FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Cette technologie repose sur l'utilisation d'un substrat FRET qui est constitué d'un fluorophore connecté à un *quencher* par une chaîne peptidique reconnue par l'enzyme ciblée. Tant que la chaîne peptidique reste intacte, le transfert d'énergie entre les deux chromophores proches dans l'espace se traduit par une forte réduction du rendement quantique du fluorophore. Par contre, lorsque la chaîne peptidique est clivée, les deux chromophores sont alors libres l'un par rapport à l'autre et le fluorophore retrouve son rendement quantique ce qui se traduit par une forte génération de fluorescence (Figure 4.4).

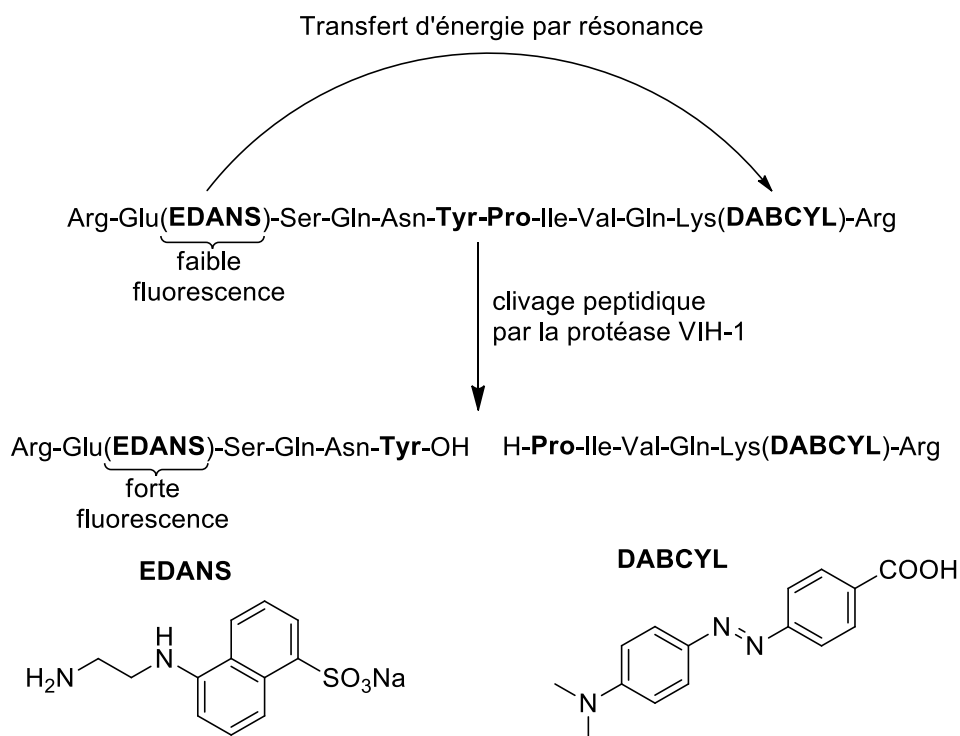


Figure 4.4. Fonctionnement de la génération d'une fluorescence par technologie FRET.

Le substrat FRET utilisé dans cette étude est un dodécapeptide avec le fluorophore EDANS (l'acide 5-(2-amino-éthylamino)-naphthalène-1-sulfonique) et le *quencher* DABCYL (l'acide 4-(7-diméthylamino-phénylazo)-benzoïque) fixé sur un acide glutamique et une lysine respectivement.<sup>117,118</sup> La séquence peptidique centrale est identique à celle du site de clivage MA/CA de la protéase VIH-1 (rappel p.23). La paire de chromophores EDANS/DABCYL est assez efficace car la longueur d'onde du maximum d'émission du fluorophore ( $\lambda_{em} = 490$  nm) se situe dans la bande d'absorption du *quencher* ( $\lambda_{abs} = 470-520$  nm). De plus le fluorophore EDANS possède un grand déplacement de Stokes ( $\lambda_{abs} = 340$  nm), ce qui permet une grande sensibilité.

Il est donc possible de suivre les cinétiques d'inhibition en mesurant la fluorescence au cours du temps lorsque le substrat FRET est mis à incuber en présence de protéase et d'inhibiteur. On peut ainsi remonter aux  $IC_{50}$  et aux constantes d'inhibition  $K_i$  par différentes méthodes. On utilise ici la pepstatine comme référence. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4.1. Constantes d'inhibitions obtenues par trois méthodes différentes pour nos composés.

Composé	K <sub>i</sub> (μM)		
	Lineweaver and Burk	Hanes	Dixon
<b>I-37</b>	528	406	492
	--	-	-
<b>W</b>	172	257	292
	+++	++	++
<b>I-34</b>	317	366	996
	+	+	--
<b>I-20</b>	395	342	306
	-	+	+
<b>I-54</b>	272	242	144
	++	++	+++
<b>I-53</b>	320	410	334
	+	-	+
<b>I-52</b>	463	1122	993
	--	---	--
pepstatine	0.051	0.052	0.036

On remarque que les meilleurs candidats à l'inhibition sont les composés **W** et **I-54**, ce qui confirme les résultats obtenus lors de l'étude précédente. On remarque également une faible inhibition pour les composés **I-34**, **I-20** et **I-53**. Au niveau des valeurs des constantes d'inhibition de **W**, on constate une différence d'un facteur 10 entre les deux études et la valeur publiée quelques années auparavant (**W** : IC<sub>50</sub> = 37 μM). Ces écarts peuvent s'expliquer par diverses raisons : entre les études *in vitro* et *in cellulo*, il faut prendre en compte les paramètres de toxicité et d'expression cellulaire et entre les études *in vitro* réalisés avec 4 ans d'écarts, les produits n'étant pas identiques il est compliqué de comparer les deux études. Ce qu'il faut retenir, c'est les différences entre deux candidats dans une même étude.

On peut donc retenir qu'un seul des candidats apporte une amélioration vis-à-vis de l'inhibition, **I-54** avec un groupement hydroxyle sur le groupement benzylique de l'urée. Cependant le gain est minime et il faudrait donc l'appui d'une structure de co-cristallisation afin de comprendre ce qu'il se passe dans le site actif de l'enzyme et ainsi pouvoir en tirer des hypothèses pour modifier notre candidat inhibiteur.

## 2. Les transporteurs membranaires, responsables malgré eux de résistances aux médicaments.

Les transporteurs membranaires sont des protéines intrinsèques à la membrane cellulaire responsables du transport membranaire des différents métabolites. Ils contrôlent ainsi les concentrations des différents ions et métabolites dans la cellule et jouent un rôle vital dans la survie de cette dernière. Il en existe deux principales catégories : les canaux et les pompes. Les canaux, assurent un transport passif alors que les pompes assurent un mouvement par couplage à une réaction enzymatique exergonique. Ce sont ces dernières qui retiendront notre attention car ce sont elles qui sont responsables de l'expulsion des molécules exogènes. Chez l'homme, ces protéines jouent un rôle prépondérant dans la biodisponibilité, la toxicité et la résistance aux médicaments.

Pour le VIH par exemple, il a été démontré que la protéine P-gp (pour *P-glycoprotein* ou ABCB1) qui est exprimée dans les lymphocytes a une influence sur les concentrations intracellulaires des médicaments de thérapie rétrovirale, dont certains inhibiteurs de protéase VIH-1. Certains composés sont également des inhibiteurs de ces transporteurs ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) ou même des inducteurs de l'expression de ces pompes.<sup>119,120</sup> Afin d'augmenter l'efficacité des inhibiteurs de la protéase VIH-1 et d'éviter de devoir prendre en même temps un inhibiteur de P-gp, il pourrait être judicieux de trouver des inhibiteurs ciblant à la fois la protéase VIH-1 et P-gp et n'étant pas transportés par ce dernier. Ainsi, les molécules actives pourraient s'accumuler dans des régions normalement inaccessibles du fait de P-gp comme le cerveau par exemple. Cette double stratégie n'a pas seulement été décrite pour le traitement du VIH<sup>121,122</sup> mais également dans certains types de cancer.<sup>123,124</sup>

La BCRP (pour *breast cancer resistance protein* ou ABCG2) appartient à la même famille de transporteur que P-gp et il a également été démontré qu'elle a une grande influence sur le transport de certains inhibiteurs.<sup>119</sup> Il pourrait donc aussi être intéressant d'en étudier les effets sur nos candidats.

### 2.1. Tests de transport

Le transport des composés cibles par P-gp a été déterminé en analysant la cytotoxicité et la résistance croisée éventuellement induite par l'expression de ces pompes. En effet une baisse de la toxicité pour les cellules exprimant un transporteur par rapport à celles ne l'exprimant pas signifie que l'inhibiteur est expulsé de la cellule. On remarque par exemple pour le composé **I-54** que les concentrations effectives médianes ( $EC_{50}$ ) des composés dans les lignées cellulaires contrôles

(NIH3T3) et dans celles où sont exprimées les pompes sont similaires (NIH3T3 MDR G185) (Figure 4.5).

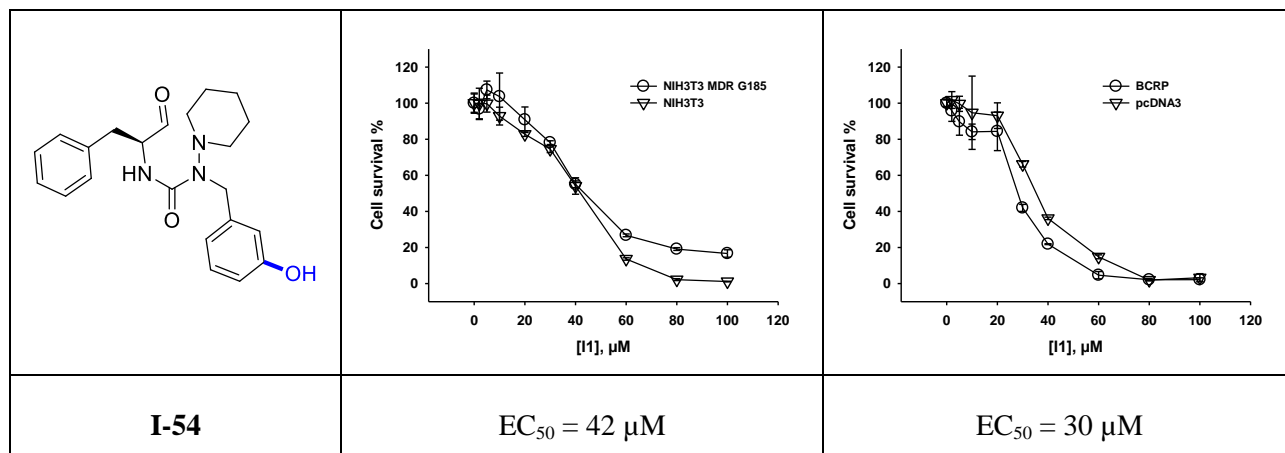


Figure 4.5. Courbes de taux de survie cellulaire en fonction de la concentration de l'inhibiteur I-54.

On peut résumer les résultats dans le tableau ci-dessous (Tableau 4.2). On remarque qu'il y a peu de différence entre les cytotoxicités pour les lignées cellulaires exprimant et non exprimant des transporteurs membranaires.

Tableau 3.2. Concentrations cytotoxiques médianes,  $IC_{50}$  (en  $\mu M$ ).

#	P-gp		BCRP	
	cellules exprimantes, %	cellules témoins, %	cellules exprimantes, %	cellules témoins, %
<b>Saquinavir</b>	49 <sup>37</sup>	37 <sup>37</sup>	-	-
<b>I-37</b>	100±1.8	68.8±2.1	57.2±0.8	56.3±0.9
<b>W</b>	48.6±0.8	42.6±0.9	34.8±2.1	37.6±1.1
<b>I-34</b>	---	79.8±1.2	---	---
<b>I-20</b>	71.2±1.7	58.6±1.6	47.9±1.6	52.4±0.4
<b>I-54</b>	43.5±0.7	42.1±1.5	23.1±1.1	35.3±1.5
<b>I-53</b>	46.8±0.9	39.4±0.7	37.2±0.9	42.6±0.7
<b>I-52</b>	12.8±0.4	11.2±0.2	12.8±0.2	17.6±0.4

On peut donc observer que nos composés montrent des comportements cytotoxiques divers : **I-37** ne montre par exemple pas de cytotoxicité, alors que **I-52** montre une forte cytotoxicité, les autres montrent une cytotoxicité moyenne. Par contre, l'expression spécifique de P-gp ou BCRP ne modifie pas l'allure des courbes de cytotoxicité, indiquant que les pompes ne transportent pas nos composés contrairement à des composés appliqués cliniquement pour leur inhibition vis-à-vis de la protéase HIV-1 comme le Saquinavir pour lequel P-gp confère une diminution de deux fois de la cytotoxicité indiquant que ce dernier est expulsé des cellules.

## 2.2. Inhibition des pompes de transports

Les tests précédents ont montrés que nos composés ne sont que peu expulsés des cellules par les transporteurs membranaires P-gp et BCRP. On peut donc se demander s'ils inhibent ces transporteurs. Pour cela, le transport de la mitoxantrone a été étudié en présence de nos candidats, avec un inhibiteur connu comme contrôle (CT1377). Les résultats sont présentés ci-dessous pour P-gp (Figure 4.6).

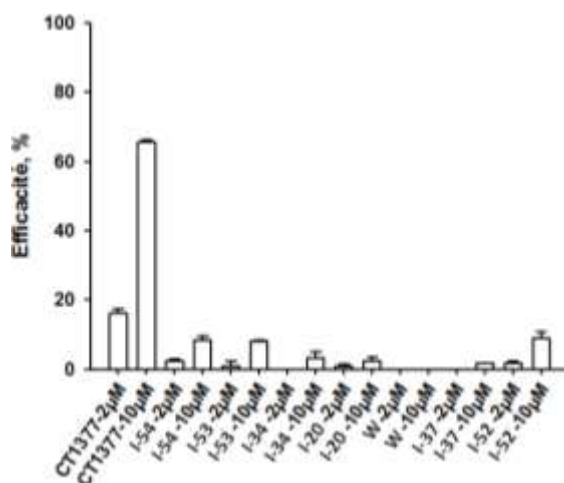


Figure 4.6.

Les effets sont similaires pour BCRP. Peu ou aucun effet sur le transport de la mitoxantrone n'a pu être détecté, suggérant que nos composés ne sont probablement pas des inhibiteurs des pompes P-gp et BCRP.

### 3. Conclusion et perspectives

Nous avons donc soumis sept candidats à divers tests *in cellulo* et *in vitro*. Au niveau de l'inhibition enzymatique, nous n'avons pas réellement réussi à améliorer le pouvoir inhibiteur de nos molécules. Cela peut s'expliquer par le fait que nous avons réalisé des modifications structurales en nous basant sur des hypothèses par rapport à des structures connues et non pas sur des études de modélisations poussées ou sur une étude structurale par co-cristallisation avec notre inhibiteur de référence. Nous avons cependant obtenu d'autres résultats comme la cytotoxicité, le transport membranaire et son inhibition. Nous avons en notre possession des molécules plutôt faiblement toxiques et qui ne sont pas transportées par P-gp et BCRP, ce qui est très satisfaisant.

Il faudra donc pour continuer cette étude, effectuer une co-cristallisation, protéase du VIH-1 – inhibiteur de référence, afin de savoir comment nos molécules se lient à l'intérieur du site actif. Ces informations nous permettront d'envisager des modifications structurales pour mieux épouser les sous-poches enzymatiques et ainsi accroître les constantes d'inhibition. Cette étude est primordiale pour savoir sous quelle forme se trouve l'interaction *NCO* dans le site actif car cette donnée, pour l'instant inconnue, nous empêche d'effectuer des calculs de *docking* cohérents.

**Partie II : Conception d'un nouvel  
oligomère bio-mimétique basée sur la  
liaison réversible NCO**





## Chapitre 5. Les foldamères : vers des structures secondaires prédéfinies

On trouve dans la nature, un nombre gigantesque de biomolécules ayant des propriétés et des fonctions très différentes. Parmi elles, on retrouve des bio-polymères tel que l'ADN et les protéines qui sont constituées de 4 et 20 unités différentes respectivement. Avec seulement 20 unités de constructions, on retrouve un nombre important de protéines susceptibles de réaliser des opérations chimiques telles que la création, la modification ou la rupture de liaisons avec une remarquable sélectivité. Ces propriétés particulières sont dues en grande partie à leur structure tri-dimensionnelle extraordinairement bien définie, qui découle de la capacité de ces biomolécules à se replier sur elles-mêmes. Le processus exact de repliement n'est pas encore bien compris, mais les raisons d'un tel repliement peuvent s'expliquer par la stabilisation de la structure finale par la multiplication d'interactions intramoléculaires non covalentes et la minimisation de la surface exposée au solvant. Pour mieux cerner le fonctionnement des protéines, le répliquer, ou l'améliorer, l'idée la plus simple est d'essayer d'imiter la nature en créant des petites molécules (par rapport aux protéines) ayant des structures tridimensionnelles. Les chimistes et biochimistes se sont donc attelés à synthétiser des oligomères biomimétiques et à en étudier les structures secondaires.

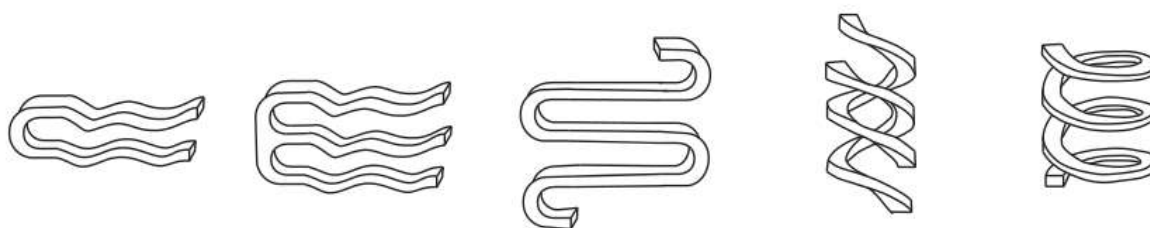


Figure 5.1. Différents types de structures secondaires : de gauche à droite : feuillets avec divers coudes, hélices.

Les structures les plus fréquentes (Figure 5.1), comme les feuillets, les hélices et les coudes, ont fait l'objet de recherches intensives depuis une vingtaine d'années. La difficulté dans le design de telles macromolécules réside dans la prédiction des structures secondaires. Afin de favoriser un certain repliement, le chimiste peut s'appuyer sur un certain nombre d'interactions faibles : forces de van der Waals, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes, et interactions pi. Il peut également faire

intervenir une certaine préorganisation pour permettre une meilleure cohésion de la super-structure obtenue. Il existe donc une infinité de possibilités pour ces macromolécules, appelées plus communément foldamères.

Le terme foldamère (de l'anglais *foldamer* : *to fold* – se replier suivi de la terminaison –mer du grec *meros* – partie) a été introduit par Gellman en 1996 pour désigner « tout polymère ayant une forte tendance à adopter une conformation compacte et spécifique ».<sup>125</sup> Cette première définition est acceptée par la plupart des chimistes même si elle pose certains problèmes de fond et de nouvelles définitions ont été depuis proposées. En effet, comme évoqué ci-dessus, les foldamères synthétisés et étudiés sont généralement des objets de petite taille pour faciliter la synthèse et l'interprétation des résultats : on rentre dans le cadre des oligomères et non dans le domaine des polymères. D'autre part, l'utilisation du terme « compacte » ne peut pas être appliquée à des molécules de petites tailles. Il est donc plus judicieux de retenir la définition proposée par Hill en 2001 qui désigne par foldamère tout « oligomère se repliant en solution en une conformation donnée stabilisée par une série d'interactions non covalentes entre unités non adjacentes ».<sup>126</sup>

Cette deuxième définition permet d'exclure un certain type de molécules qui ont tout de même une structure secondaire bien définie mais qui n'est pas due à des interactions faibles, comme par exemple les hélicènes ou les molécules *geländer* dont le repliement est assuré par une torsion répétée du monomère ((a) et (b) Figure 5.2).<sup>127,128</sup> On peut également exclure grâce au terme oligomère, les molécules de très faible taille dont le repliement est assuré par des liaisons entre unités adjacentes ((c) Figure 5.2) et les polymères présentant généralement des collections de structures repliées.<sup>129-132</sup>

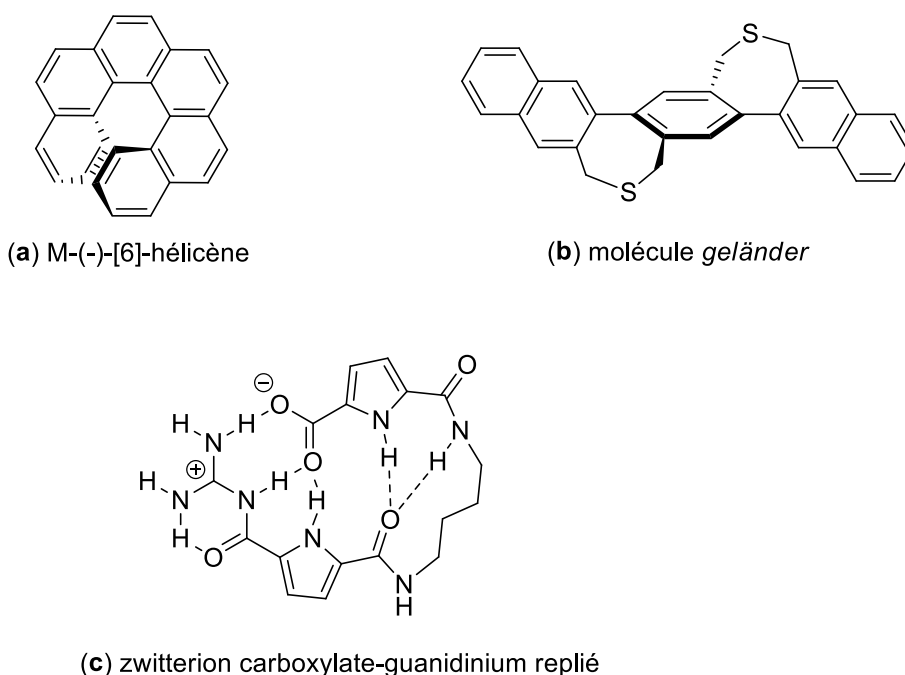


Figure 5.2. Molécules présentant une structure secondaire définie mais qui ne seront pas considérées comme des foldamères.

Ce chapitre bibliographique abordera dans un premier temps quelques concepts importants pour cerner l'action de repliement et présentera un tour d'horizon des types de foldamères qu'on peut atteindre. Puis nous nous intéresserons à l'importance de la nature du solvant et à la première tentative de créer un foldamère basé sur la liaison *NCO*, favorisée en milieu aqueux.

## 1. Notion de repliement et moyens de caractérisation

### 1.1. Réaction de repliement

#### 1.1.1. Aspect thermodynamique

Considérons un polypeptide de 4 acides aminés (Figure 5.2), la conformation de chaque acide aminé peut être décrite par 3 angles dièdres. Ces angles dièdres possèdent des valeurs préférentielles du fait de la structure de l'acide aminé, ainsi  $\Omega$  est généralement fixé à  $180^\circ$  du fait du caractère partiel de double liaison de la liaison peptidique qui bloque la rotation autour de la liaison C-N en plaçant les deux carbones, l'oxygène, l'azote et son proton dans un même plan. On compte jusqu'à 11 angles de torsions différents pour chaque acide aminé mais on peut considérer qu'en moyenne il peut y en avoir entre 2 et 3.<sup>133-135</sup> Si on note  $\omega$  le nombre d'angles de torsion envisageables par acide aminé, on peut alors dénombrer  $\omega^4$  conformations pour ce polypeptide de 4 acides aminés.

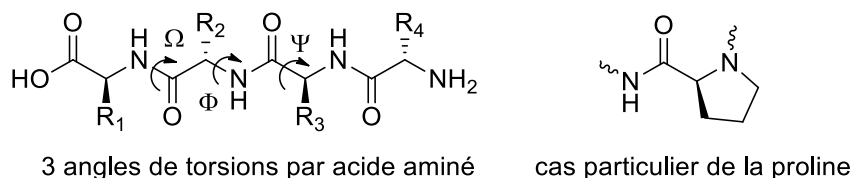


Figure 5.3. Angles de torsions dans une chaînes de peptides.

On peut généraliser que pour tout oligomère de  $N$  monomères ayant chacun  $\omega$  angles de torsion envisageables, on dénombre alors  $\omega^N$  conformations. Ce dénombrement est bien évidemment une estimation haute du nombre de conformations mais il permet de peaufiner la définition des foldamères et de montrer comment on peut favoriser un repliement. En effet dans le cas où un seul angle de torsion est envisageable (telles que les hélicènes ou les molécules *geländer*) on ne peut avoir de phénomène de repliement puisqu'il n'existe qu'une seule et unique conformation. Cela renforce l'exclusion de ces molécules de la définition des foldamères. De plus, on visualise très bien que le repliement sera favorisé s'il existe un faible nombre de conformations possibles et donc si on limite le nombre de degrés de liberté. Cette organisation ou cette perte de désordre se traduit par une diminution de l'entropie qu'il faut alors compenser.

Il est donc nécessaire d'avoir un gain enthalpique suffisant pour assurer une cohésion structurale de l'oligomère. Ceci peut être atteint en multipliant le nombre de liaisons intramoléculaires. Il faut cependant qu'elles soient d'une nature faible et non covalentes pour permettre à l'oligomère de balayer un grand nombre de conformations en un temps raisonnable afin de trouver la forme thermodynamiquement la plus stable.

Dans toutes ces considérations thermodynamiques, il ne faut pas oublier le solvant qui peut intervenir sur plusieurs paramètres du repliement. Du côté entropie, on vient de voir que le repliement se traduisait par une diminution de l'entropie du fait de la perte de degrés de liberté mais il y a également le phénomène de désolvatation de la macromolécule qui s'accompagne lui d'un gain entropique. En effet la sphère de solvation de la molécule repliée est plus petite que celle de la molécule dépliée et il y a donc moins de molécules de solvant dans celle-ci. On retrouve ce phénomène dans le repliement des protéines sous l'appellation abusive de « force hydrophobe ». Du côté enthalpique, il faut veiller à ce que les liaisons intramoléculaires présentes au sein du foldamère soient plus fortes et/ou plus nombreuses que les interactions entre le solvant et la molécule sans quoi le repliement n'aura jamais lieu. On peut également jouer sur ce paramètre pour ouvrir des macromolécules comme l'usage de dénaturant pour déplier les protéines (urée ou chlorure de guanidinium par exemple).

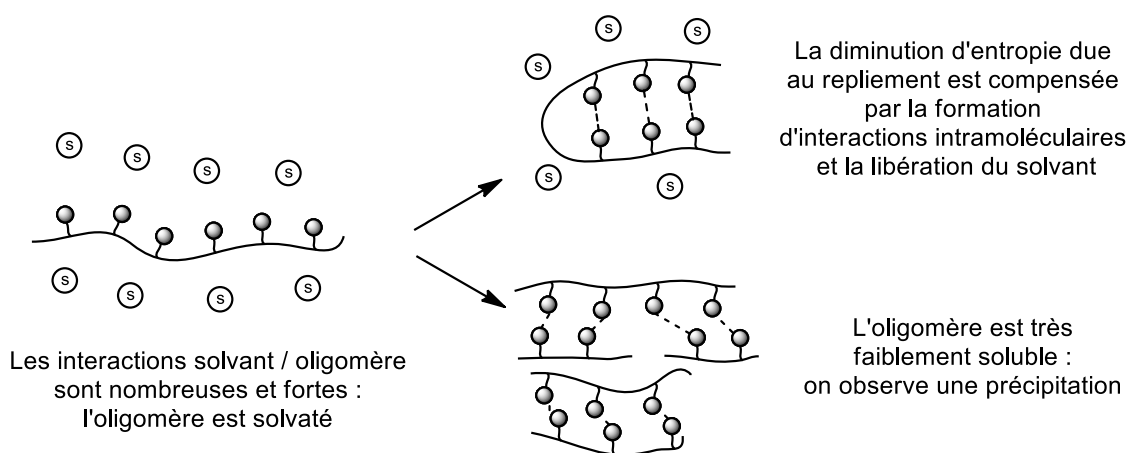


Figure 5.4. Influence du solvant sur le repliement de l'oligomère.

La Figure 5.4 résume les paramètres à prendre en compte dans l'élaboration d'un foldamère : il faut veiller à ce qu'il ne soit pas trop solvate mais néanmoins suffisamment pour éviter la précipitation. Ces paramètres sont d'autant plus importants lorsqu'on travaille en milieu aqueux car l'eau est un milieu extrêmement compétitif et surtout capable de liaisons hydrogènes ce qui rend l'utilisation de ces dernières quasiment impossible car elles interagiraient préférentiellement avec le solvant.

### 1.1.2. Effet coopératif

On vient de voir que la réaction de repliement repose sur un certain nombre de paramètres thermodynamiques mettant en jeu l'oligomère lui-même, mais également le solvant. Cependant, nous n'avons pas encore évoqué la notion de coopérativité. Cette dernière se définit par la capacité d'un oligomère à se replier en une conformation quasi-unique, grâce à l'induction de liaisons faibles par la formation d'autres liaisons faibles. Les biomolécules, par exemple, se caractérisent par de très forts effets coopératifs ce qui leur confère des propriétés et une structure si uniques. La coopérativité implique la formation de liaisons non covalentes entre des unités non adjacentes (Figure 5.5).

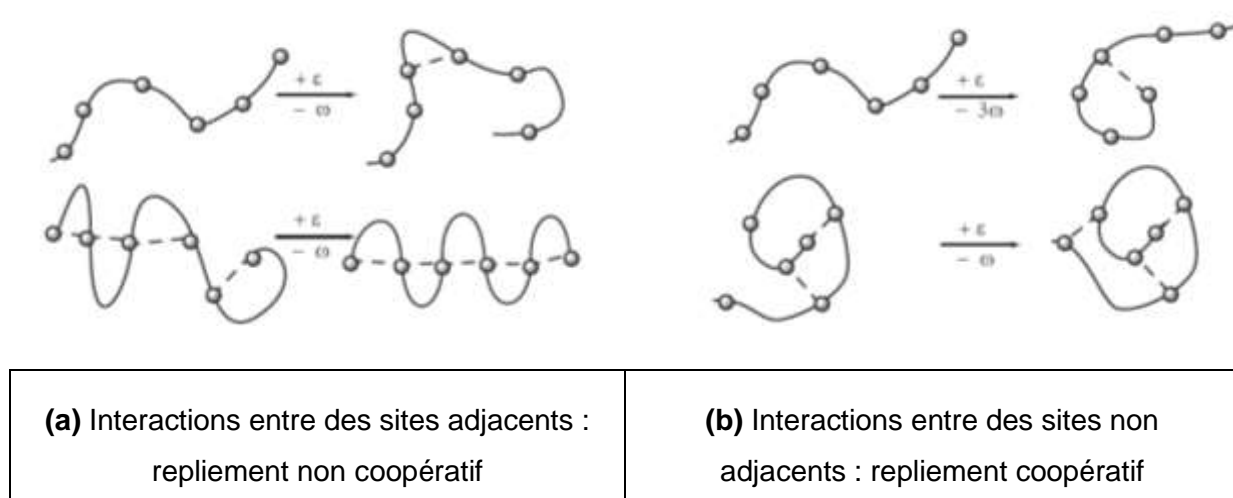


Figure 5.5. Origine de la coopérativité.

Dans le cas d'interactions entre des unités adjacentes, la formation d'une liaison provoquera à chaque fois la même diminution d'entropie et le même gain enthalpique. On obtiendra donc des mélanges de conformations avec des enthalpies très proches. En revanche, dans le cas d'interactions plus lointaines, plus le repliement sera avancé, moins la perte d'entropie sera élevée, on tend donc systématiquement vers une forme totalement repliée et thermodynamiquement beaucoup plus stable que toutes les autres.

## 1.2. Moyens de caractérisation

Une fois les clés en mains pour comprendre le repliement, il faut pouvoir étudier la structure tertiaire en solution. Pour cela, il existe toute une panoplie de méthodes pouvant donner des informations sur la structure de l'oligomère, que nous allons maintenant présenter.

### 1.1.1. Dichroïsme circulaire

Une des techniques très en vogue est le dichroïsme circulaire (CD pour *circular dichroism*) qui permet d'obtenir des signatures caractéristiques pour différentes structures secondaires.<sup>136</sup> Il s'est imposé comme un outil quasi-indispensable à l'étude des oligomères peptidomimétiques. Les groupes de Gellman et Seebach ont par exemple développé une grande expertise dans le domaine.

L'un des attraits de cette technique est de pouvoir tirer des corrélations entre l'intensité de l'effet Cotton (*i.e.* variations du pouvoir rotatoire en fonction de la longueur d'onde) et le repliement. La présence d'un spectre présentant un fort effet Cotton présuppose la présence d'une conformation majoritaire. Il est alors facile d'étudier les effets du solvant, du pH, de la température, de la concentration sur la tendance de l'oligomère à se replier.

En revanche, il est impossible de tirer des conclusions quant à la structure secondaire sans l'utilisation des données de RX ou de RMN : par exemple deux oligomères présentant une structure en hélice 14 peuvent avoir des spectres de CD différents et deux oligomères présentant deux structures différentes peuvent avoir des spectres de CD similaires (Figure 5.6).

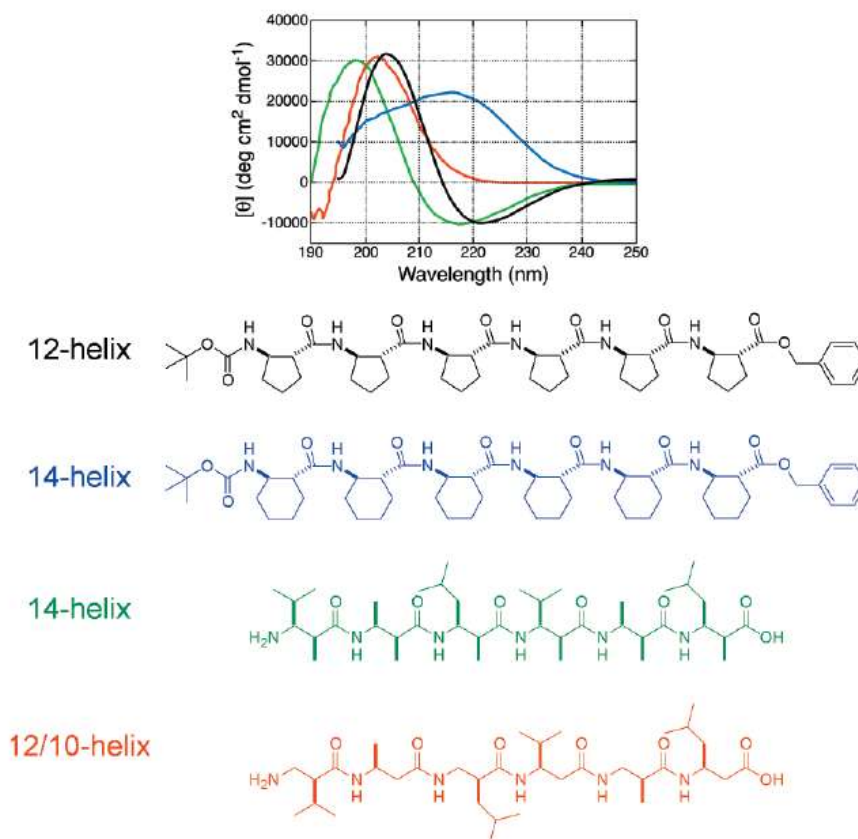


Figure 5.6. Etude des  $\beta$ -peptides par dichroïsme circulaire.<sup>126</sup>

### 1.1.2. Résonance magnétique nucléaire

La RMN permet d'obtenir un grand nombre d'informations sur la structure secondaire d'un oligomère. Les constantes de couplage des protons diastéréotopiques par exemple peuvent servir de descripteurs sur l'angle de torsion de l'oligomère. L'effet NOE permet d'autre part d'accéder à la distance entre différents protons et de remonter à la structure secondaire. On peut ainsi distinguer les différents types d'hélices en déterminant les distances entre les protons engagés dans les interactions hydrogène et les atomes environnants (Figure 5.7).

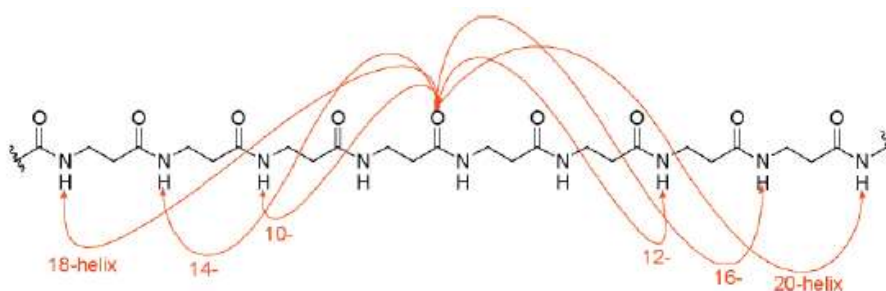


Figure 5.7. Structures envisageables pour les  $\beta$ -peptides selon la liaison H créée.<sup>126</sup>

### 1.1.3. Autres techniques

Afin de compléter les analyses précédentes, on peut également avoir recours aux techniques suivantes :

- la diffraction des rayons X permettant d'avoir accès à la structure tridimensionnelle de l'oligomère à l'état cristallin.<sup>137,138</sup> Pour pouvoir utiliser cette technique, il faut tout d'abord réussir à cristalliser l'oligomère en question, tâche qui se révèle de plus en plus ardue avec la taille croissante des chaînes à étudier. L'étude de la structure à l'état solide peut aider à comprendre le comportement de la molécule en solution mais il ne faut pas confondre les deux ;
- la spectroscopie IR permettant notamment de repérer les liaisons hydrogènes ;<sup>139,140</sup>
- l'absorption UV dont les spectres peuvent évoluer selon la proximité des chromophores les uns par rapport aux autres dans les foldamères présentant de telles fonctions ;<sup>18</sup>
- la fluorescence permettant, comme l'absorption UV, de repérer un éventuel rapprochement de fluorophores dans les **a**edamères (*a*romatic *e*lectron *d*onor-*a*cceptor) et les oligomères aromatiques ;<sup>15</sup>



- la microcalorimétrie permettant d'accéder aux données thermodynamiques relatives à la réaction de repliement.<sup>141-143</sup>

## 2. Aperçu des différents types de foldamères et de leurs applications potentielles

### 2.1. Différents types de structures

La liste exhaustive des différents foldamères est bien trop longue pour être décrite ici.<sup>8,126,144</sup> Je me contenterai de présenter un bref aperçu de différents types de foldamères et de leurs applications. La recherche autour des foldamères s'est logiquement inspirée de la nature et un grand nombre de foldamères dits « peptidomimétiques » ont vu le jour avec les peptoides,<sup>12</sup> les  $\beta$ -peptides,<sup>9,125</sup> les  $\gamma$  et  $\delta$ -peptides (Figure 5.8). En parallèle, les recherches sur de nouveaux types de foldamères, non bio-inspirés, ont également permis de concevoir des structures originales et des modes de repliement bien distincts. On retrouve notamment des séquences riches en noyaux aromatiques comme les oligoamides aromatiques,<sup>16</sup> les aedamères,<sup>145</sup> les oligomères aza-aromatiques,<sup>146</sup> etc... (Figure 5.8).

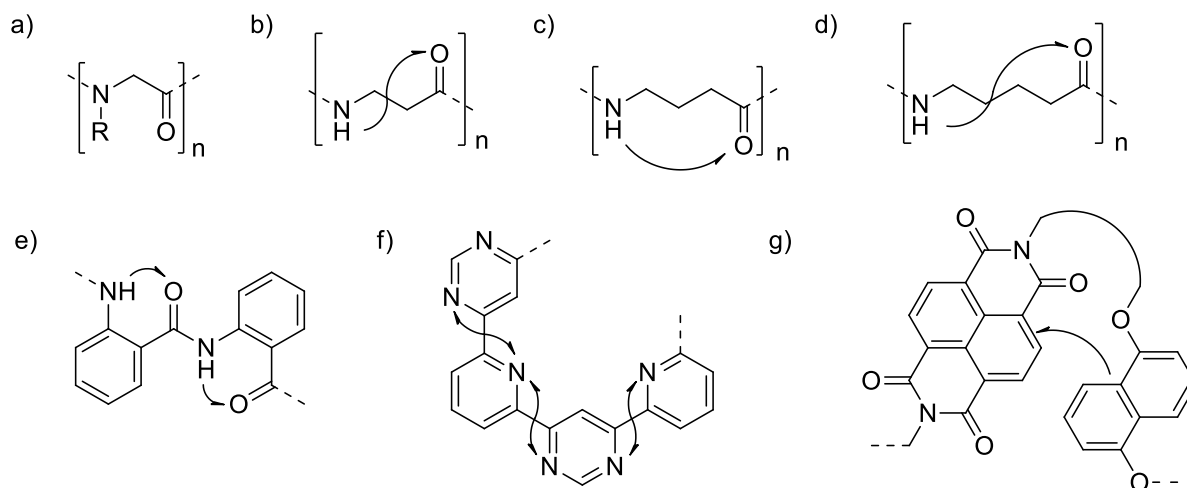


Figure 5.8. Exemples de squelettes de foldamères. (a) peptoides, (b)  $\beta$ -peptides, (c)  $\gamma$ -peptides, (d)  $\delta$ -peptides, (e) oligoamides aromatiques, (f) oligomères aza-aromatiques, (g) les aedamères.

Il existe donc une grande diversité de nature de foldamères et il ne fait aucun doute que cette variété augmentera dans les années à venir bien que le design, la synthèse et la caractérisation de ces assemblages peuvent se révéler très complexes. Cependant, les structures secondaires de repliement sont beaucoup moins diverses que l'on pourrait imaginer, en comparaison avec le nombre de squelettes différents. Les principaux motifs trouvés dans les biomolécules (hélices, brins, feuillets et

coude) apparaissent comme les motifs omniprésents dans la plupart des foldamères, ce qui est attendu d'après les études théoriques.

## 2.2. Vers des séquences hétérogènes

La plupart des structures présentées précédemment sont constituées d'un squelette homogène, *i.e.* constituées exclusivement d'un monomère d'une unique famille. Afin de diversifier encore les structures, il est possible de composer un foldamère de blocs se différenciant par leur chaîne latérale comme les peptides mais aussi de coupler des blocs de familles différentes. Il est, par exemple, possible d'alterner des  $\alpha$ ,  $\beta$  et/ou  $\gamma$  peptides afin d'obtenir une gamme de conformations hélicoïdales variée (répétitions au niveau des dimères  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\beta\gamma$ , des trimères  $\alpha\alpha\beta$ ,  $\alpha\beta\beta$  ...).<sup>147</sup> Cette diversité de types de liaisons pourrait permettre d'imiter les peptides à un stade encore plus avancée, en utilisant une alternance de structures secondaires, conférant ensuite à la molécule une structure tertiaire bien définie. On pourra donc, par un assemblage judicieux, créer des systèmes de toutes formes et volumes présentant des cavités et surfaces bien définies.

## 2.3. Applications

De par leur diversité de formes et de surfaces, les foldamères représentent une nouvelle gamme de composés pouvant interagir avec des biomolécules et ainsi modifier ou perturber leurs fonctions. Ils présentent en effet de bonnes caractéristiques pour cibler des bio-polymères : une taille moyenne ( $M = 500 - 5000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) présentant des surfaces larges propices aux interactions aux interfaces protéine-protéine; une diversité de formes, de repliements, de tailles, de ramifications ; et une résistance à l'hydrolyse.

Des travaux préliminaires se sont focalisés sur le design de foldamères amphiphiles cationiques imitant les peptides anti-microbiens, comme la magainine ou la moricine (des  $\alpha$ -hélices cationiques, qui ont pour fonction de perturber les membranes bactériennes,). De nombreuses hélices basées sur des  $\beta$ -peptides, des peptoides polyproline, des oligo-urées et des oligo-(urée/amide) ont été décrites. Ces travaux, encore très théoriques, vont devoir désormais se pencher sur les aspects pharmacophores de telles constructions afin d'obtenir une bonne pharmaco-cinétique, une bonne perméabilité cellulaire, une faible immunogénicité et une bonne activité chez des modèles animaux. De bons espoirs sont permis avec le développement d'un agent antibactérien à partir d'un foldamère oligoamide aromatique.<sup>148</sup>

Dans la continuité des études présentées précédemment, les foldamères ont également été étudiés pour imiter les sites actifs d'enzyme, soit en encapsulant des hôtes organiques, soit en complexant des métaux et pouvant donc effectuer un effet catalyseur.

### 3. Vers des foldamères hydrosolubles

Le véritable obstacle pour accéder à des foldamères pouvant avoir une activité biologique notable est d'obtenir une solubilité en milieu physiologique tout en gardant une structure repliée. Les  $\beta$ -peptides, par exemple, ont très rapidement été désignés comme de nouveaux agents anti-microbiens mais, malheureusement, ils perdent généralement leur structure bien définie en milieu aqueux. Cela s'explique simplement par le fait que la structure des  $\beta$ -peptides est assurée par des liaisons hydrogènes qui entrent alors en compétition avec l'eau. Nous présentons ici les différentes techniques permettant d'assurer cette cohésion de structure en milieu aqueux.

#### 3.1. Formation d'un macrocycle

Une première technique consiste à ajouter une liaison covalente permettant de rigidifier la structure une fois celle-ci formée. On peut, par exemple, stabiliser une hélice d' $\alpha$ -peptides en y ajoutant un pont (Figure 5.9).<sup>149</sup> Cette structure pontée peut, par exemple, être une liaison disulfure, un lactame, une double liaison créée par métathèse ou même une liaison métal-ligands.<sup>150-153</sup> Cette méthodologie a également été appliquée à la chimie de  $\beta$ -peptides et les résultats de stabilité des hélices ont pu être prouvés par étude de dichroïsme circulaire et par étude RMN.

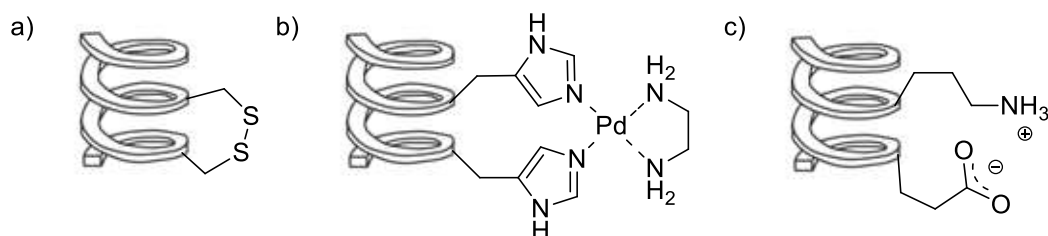


Figure 5.9. Différents types de liaisons pouvant stabiliser une hélice  $\alpha$ .

Une méthode similaire mais non covalente consiste à utiliser les interactions ioniques de chaînes latérales pour former des pseudo-ponts stabilisant la structure secondaire.<sup>154</sup>

### 3.2. Rigidification de la chaîne oligomérique

Une autre méthode consiste à limiter la flexibilité de la chaîne oligomérique, en introduisant des monomères fortement préorganisés, comme l'acide trans-aminocyclohexane carboxylique (ACHC) ou l'acide trans-aminocyclopentane carboxylique (ACPC).<sup>137</sup> L'utilisation de ces monomères contraint le foldamère à adopter une structure très rigide mais confère également une hydrophobicité élevée. Pour contrebalancer cet effet, ces groupements sont alors incorporés au milieu d'une chaîne comportant des groupements hydro-solubilisants comme des  $\beta$ -acides aminés dérivés de la lysine et de l'acide glutamique (Figure 5.10). Cette succession de groupements anioniques, cationiques et préorganisés permet d'accéder à des foldamères très stables dans l'eau grâce à la formation de ponts salins pour des pH compris entre 2 et 12.<sup>155</sup>

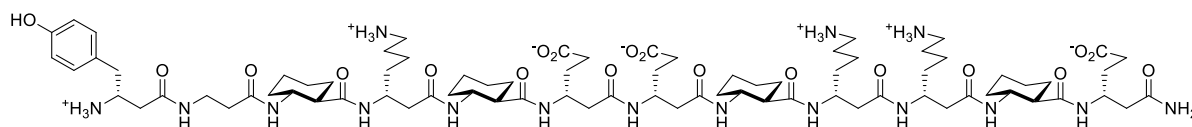


Figure 5.10. Oligomère couplant la préorganisation des ACHC et la formation de ponts salins.<sup>155</sup>

### 3.3. Utilisation d'une interaction favorisée en milieu aqueux : la liaison NCO

Il y a une dizaine d'années, Romain Barbe débute l'exploration d'une troisième méthode pour concevoir et synthétiser un nouvel oligomère biomimétique susceptible d'adopter une structure secondaire en milieu physiologique. L'idée est de s'appuyer sur l'interaction NCO, décrite au début de ce manuscrit, et non plus sur des interactions classiques. Cette interaction a l'avantage d'être favorisée en milieu aqueux et l'incorporation de plusieurs de celles-ci dans un foldamère pourrait en permettre le repliement en milieu fortement compétitif (Figure 5.11).<sup>156,157</sup>

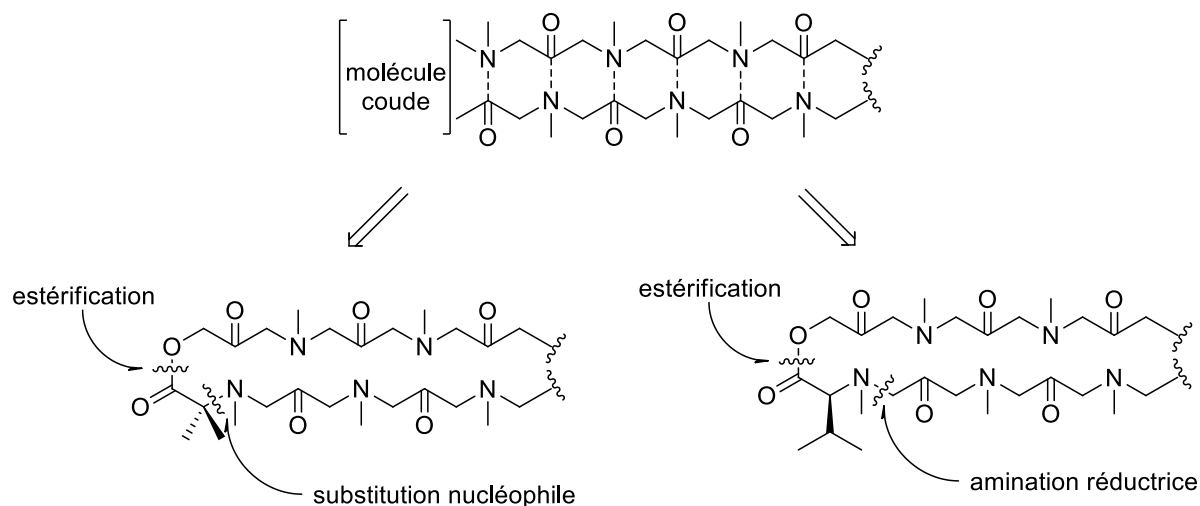


Figure 5.11. Foldamère cible de Barbe et deux hypothèses de coudes pour forcer le repliement.

Une étude théorique poussée a permis de dégager un squelette type (Figure 5.11) constitué de groupements cétones et amines tertiaires espacés par un  $\text{CH}_2$  et d'une molécule coude afin de favoriser le repliement. Les modélisations réalisées laissent penser qu'un repliement est envisageable et a permis de dégager deux molécules concaves. Une étude rétrosynthétique a ensuite permis d'envisager deux voies d'accès à partir du glycidol et du bromopyruvate d'éthyle (Figure 5.12).

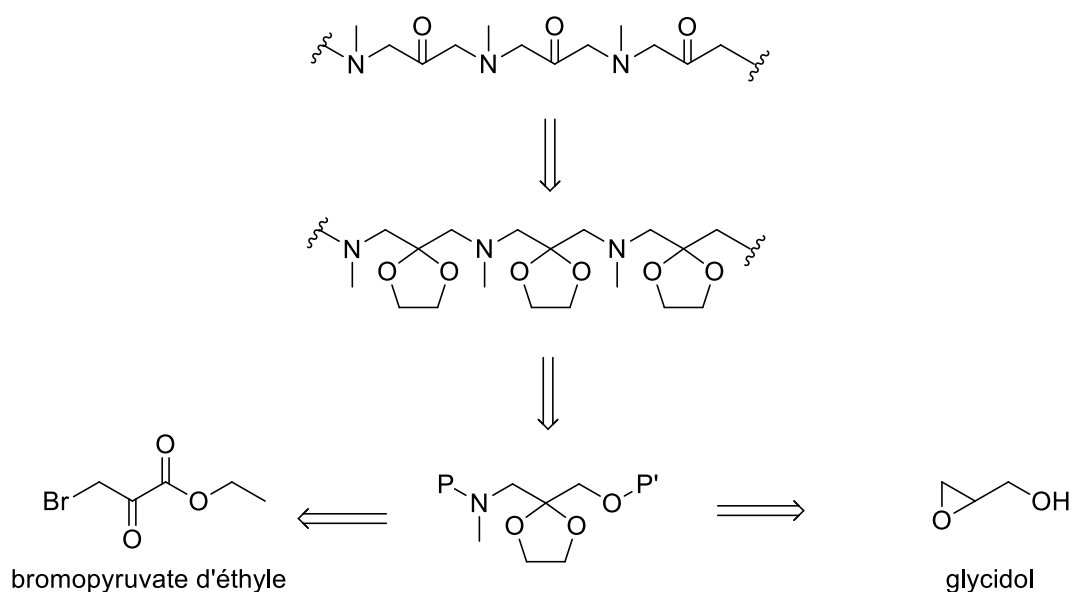


Figure 5.12. Analyse rétrosynthétique réalisée par Barbe en 2004.

Pour des problèmes de stabilité des composés, la voie du glycidol a été retenue et un premier monomère a été isolé, avec pour groupements protecteurs, un acétal cyclique pour la cétone, un éther *t*-butyldiméthylsilylé et un groupement Fmoc. Ce monomère a ensuite été soumis à une oligomérisation et un tétramère a pu être isolé grâce à des réactions d'amination réductrice. Malheureusement, les acétals n'ont jamais pu être déprotégés et, par conséquent, aucune étude de

repliement n'a pu être effectuée. En effet, dans les conditions de clivage de l'acétal, *i.e.* en milieu acide, les amines se protonent et, de ce fait, déplacent la densité électronique du centre de l'acétal vers les dites amines rendant l'acétal inerte vis-à-vis de l'hydrolyse (Figure 5.13). Il a été démontré que ces acétals étaient stables même dans de l'acide sulfurique concentré à reflux.

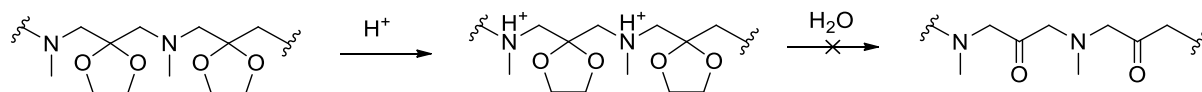


Figure 5.13. Tentatives de déprotection des acétals.



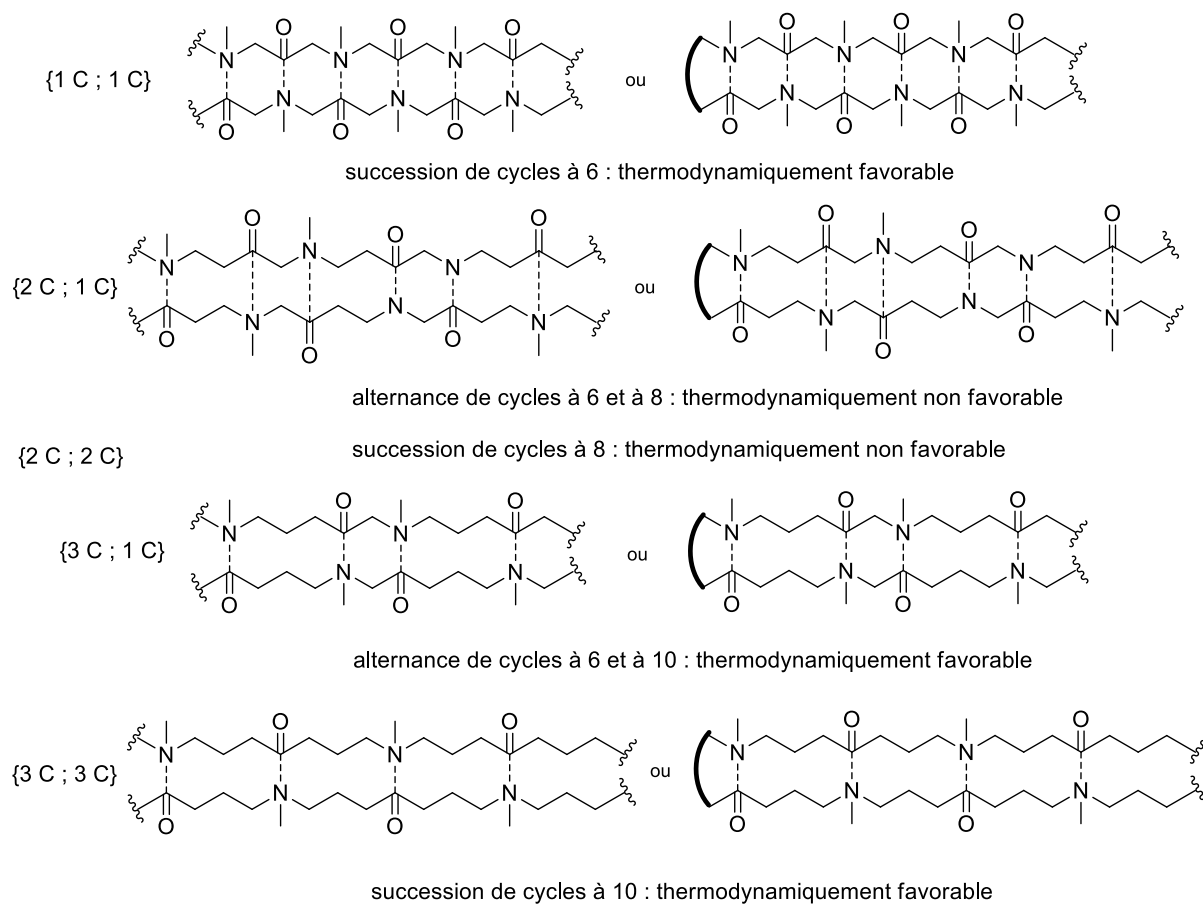
## Chapitre 6. Conception et synthèse d'un nouveau foldamère

### 1. Objectif du projet : nouvelle stratégie

Afin de s'affranchir des problèmes rencontrés par R. Barbe (*i.e.* impossibilité de déprotéger les cétones), on peut envisager plusieurs stratégies : ajouter de la distance entre la fonction cétone protégée et une ou deux fonctions amines afin de faciliter la déprotection et/ou changer de groupement protecteur vers quelque chose de plus facilement clivable. Il faut également garder en mémoire que nous souhaitons procéder à l'oligomérisation par la suite. Pour cela, il faut une synthèse de monomère réalisable dans une durée plutôt raisonnable, avec un coût moindre et sur une échelle multi-gramme.

Dans le cas précédent, les unités cétones et amines étaient séparées par un seul carbone afin de former un cycle à 6 membres dans l'hypothèse où deux interactions NCO prendraient place côte à côte pour former un feuillet béta par exemple (cas 1 de la Figure 6.1). Pour continuer avec l'idée de rajouter de la distance entre les fonctions amines et cétones, on peut envisager plusieurs scénarios détaillés dans la Figure 6.1. Dans le cas où les groupements amines et cétones sont séparés par 2 carbones, on obtiendrait, toujours dans l'hypothèse de deux interactions NCO côte à côte, des cycles à 8 membres, ce qui n'est pas thermodynamiquement favorable. Par contre, dans le cas où les groupements sont séparés par 3 carbones, on obtiendrait des cycles à 10 membres ce qui redevient thermodynamiquement réalisable. On peut donc envisager deux solutions pour former des molécules plus à même de se replier : soit une solution symétrique avec 3 carbones de chaque côté de la cétone, soit une solution asymétrique avec 1 carbone d'un côté et 3 carbones de l'autre.





**Figure 6.1. Possibilité d'interaction NCO en fonction du nombre de carbones entre les fonctions cétones et amines.**

Une fois la structure de l'oligomère choisie, il faut :

- choisir la méthode de couplage et ainsi définir les monomères ;
- choisir des précurseurs bons marchés pour obtenir les dits monomères ;
- tester et mettre au point leur synthèse ;
- tester et mettre au point leur couplage ;
- tester la déprotection des cétones pour valider notre stratégie ;
- étudier le possible repliement d'un oligomère d'une certaine taille.

Il s'agit donc tout d'abord de procéder à une analyse rétrosynthétique poussée.

## 2. Analyse rétrosynthétique

Une fois le squelette du foldamère conçu, il « reste » à imaginer une synthèse efficace. Comme pour l'étude de R. Barbe, la réaction de couplage choisie pour l'obtention des oligomères sera la réaction d'amination réductrice. Cette dernière présente en effet l'avantage de présenter un rendement plutôt élevé et d'avoir déjà été utilisée en synthèse sur support solide, but ultime de ce projet.<sup>158-161</sup> Afin d'effectuer ce couplage, le monomère doit comporter trois fonctions chimiques distinctes, une amine secondaire, un aldéhyde et une cétone, protégées par des groupements orthogonaux ou cachées sous une autre fonction (Figure 6.2).

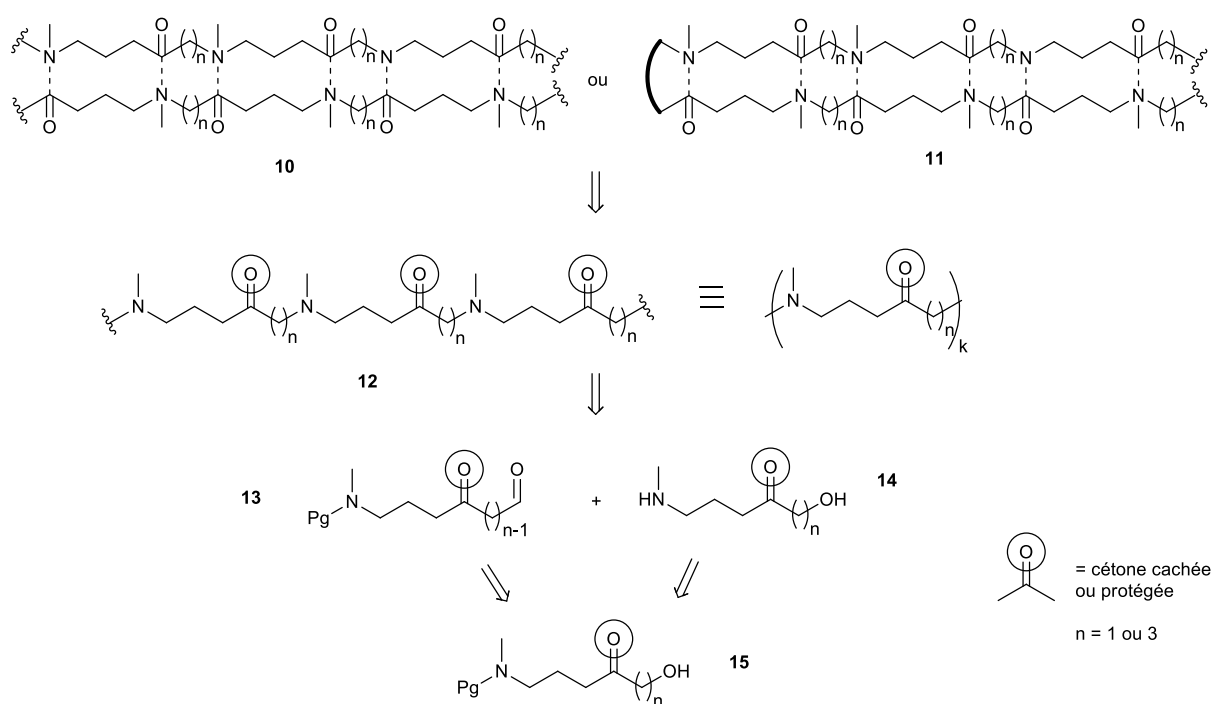


Figure 6.2. Analyse rétrosynthétique.

Idéalement, il nous faut donc synthétiser de grandes quantités de monomères afin de pouvoir tester et produire différentes tailles d'oligomères. Pour cela, il est primordial de mettre au point des synthèses rapides, efficaces et à partir de composés peu onéreux.<sup>162</sup> Plusieurs stratégies ont été retenues et on peut les classer en fonction du nombre d'atomes de carbone ( $n$ ) que comporte le monomère. Dans le cas où  $n = 1$  (Figure 6.3), on peut envisager plusieurs monomères en fonction de la position de la cétone protégée ou cachée (du côté de l'amine ou du côté de l'alcool) et en fonction de la stratégie de protection de la cétone. Le choix le plus simple est de la protéger sous forme d'un acétal acyclique, pour qu'il soit plus facilement clivable. Mais on peut également cacher la cétone sous la forme d'une liaison méthylène qui pourrait être clivée en fin de réaction par ozonolyse.

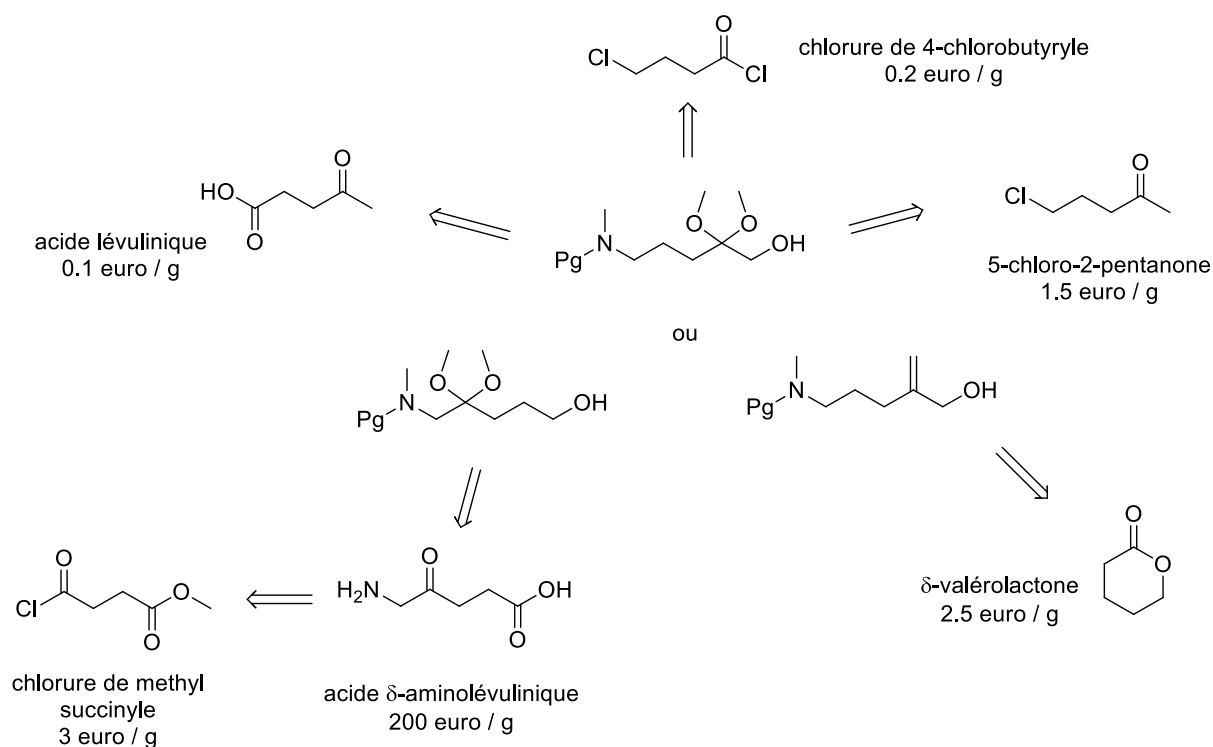


Figure 6.3. Aperçu des différents monomères cibles et de leurs précurseurs.

Cinq composés ont été identifiés et différentes synthèses envisagées (détaillées dans la partie suivante). La diversité des synthèses nous permettra de vite rebondir en cas de problème.

La deuxième option repose sur l'éloignement de toutes les trois fonctions avec  $n = 3$ . Dans ce cas, peu de molécules sont commercialement disponibles et seul un précurseur potentiel a été isolé (Figure 6.4).

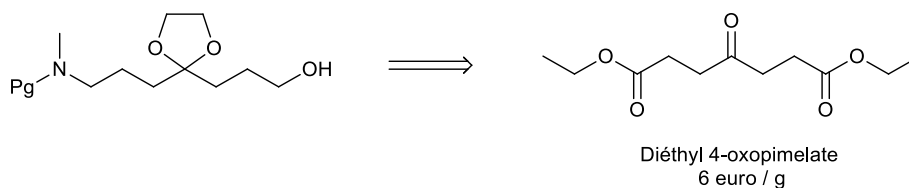


Figure 6.4. Monomère à 7 carbones et son potentiel précurseur.

La partie suivante présente les différentes tentatives à partir des précurseurs présentés ci-dessus.

### 3. Synthèse des différents monomères

#### 3.1. Synthèse à partir de la 5-chloro-2-pentanone

Nous avons, dans un premier temps, exploré la voie à partir de la 5-chloro-2-pentanone passant par un intermédiaire éther d'énol formé à partir du diméthyl-acétal correspondant, par réaction avec du tri-isobutylaluminium (Figure 6.5).<sup>163</sup> L'éther d'énol formé sélectivement sur la position terminale pourrait permettre de réaliser l'introduction du groupement hydroxyle terminal.

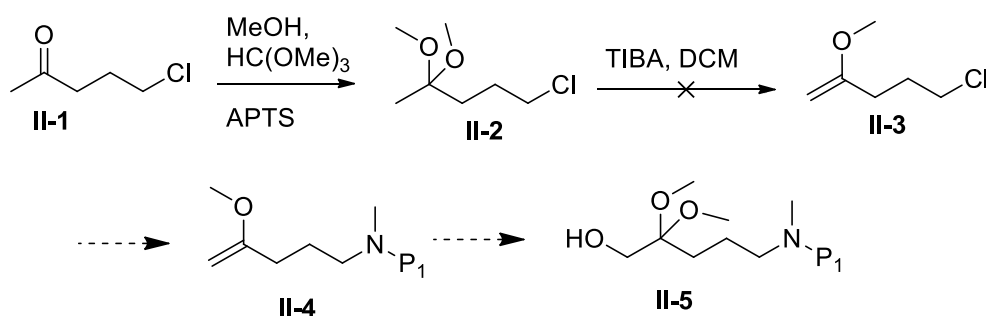


Figure 6.5. Synthèse à partir de la 5-chloro-2-pentanone.

L'acétal est aisément obtenu en grande quantité dans des conditions classiques. Par contre, du fait de l'absence de protocoles pour la deuxième étape, il a été impossible de la reproduire et le seul produit isolé en très faible quantité a montré une double liaison de l'autre côté que le produit **II-3** attendu. Le manque de bibliographie et de citations de l'article sur lequel est basé cette synthèse nous a rapidement poussé à changer de voie.

#### 3.2. Synthèse à partir de l'acide lévulinique

Nous avons ensuite exploré la voie de synthèse présentée ci-après (Figure 6.6). L'acide lévulinique peut être halogéné sélectivement sur la position terminale grâce à l'utilisation de dibrome avec un rendement modeste, mais le faible coût des réactifs permet de réaliser la réaction à grande échelle et d'obtenir une dizaine de grammes de produit facilement.<sup>164</sup> On peut ensuite choisir d'introduire l'amine du côté du brome ou du côté de l'ester. L'introduction du côté de l'ester nécessitera une hydrolyse de la bromo-cétone et une protection de l'aldéhyde alors que l'introduction du côté du brome pourrait être effectué avec ou sans protection préalable de la cétone, en théorie.

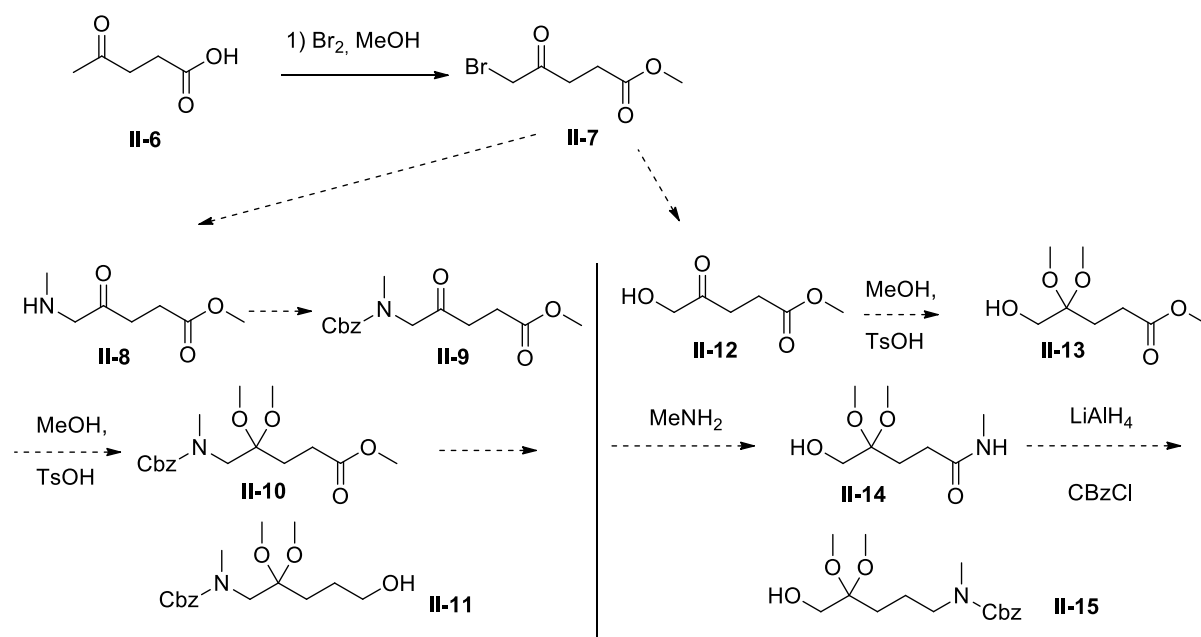
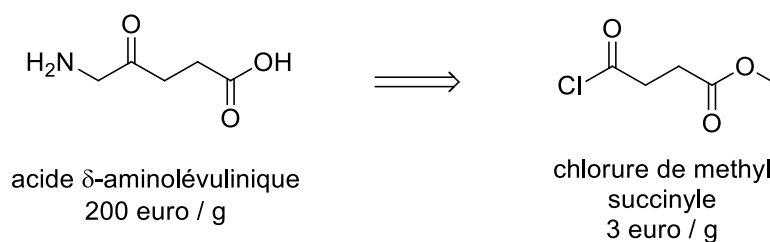


Figure 6.6. Synthèse à partir de l'acide lévulinique.

Malheureusement, la substitution nucléophile de la bromo-cétone se révéla être plus compliquée que prévu et donne lieu à de nombreux sous-produits. L'amination donna lieu à des mélanges d'amides ouverts ou cycliques et une amination partielle de la position en alpha du carbonyle. L'hydrolyse, elle, se révéla encore plus ardue et nécessita des conditions drastiques décomposant notre réactif avant réaction totale.

### 3.3. Synthèse inspirée de celle de l'acide $\delta$ -aminolévulinique

Dans la continuité de la synthèse précédente, nous avons pu isoler un précurseur presque parfait présentant déjà trois fonctions distinctes proches de celle voulue, l'acide  $\delta$ -aminolévulinique synthétisé à partir de chlorure de méthylsuccinyle (Figure 6.7).<sup>165,166</sup>

Figure 6.7. Acide  $\delta$ -aminolévulinique et son précurseur, le chlorure de méthylsuccinyle.

La cohabitation de l'amine et de la cétone n'est possible que par la forme zwitterionique de l'acide aminé. Dans notre cas, il semble indispensable pour la suite de la synthèse de protéger la fonction cétone. En nous inspirant des synthèses de l'acide  $\delta$ -aminolévulinique, nous avons d'abord formé un groupement cyanoformate à l'aide de cyanure de cuivre (Figure 6.8). Afin de réduire le nombre d'étapes, nous avons envisagé la protection de la pseudo-cétone puis la réduction totale du groupement cyano et de l'ester. Malheureusement, le groupement cyanoformate est en réalité une forme activée d'un groupement carboxyl et le cyano est un bon groupement partant.<sup>167</sup> La tentative d'acétalisation a ainsi conduit au diester **II-19** de façon quantitative.

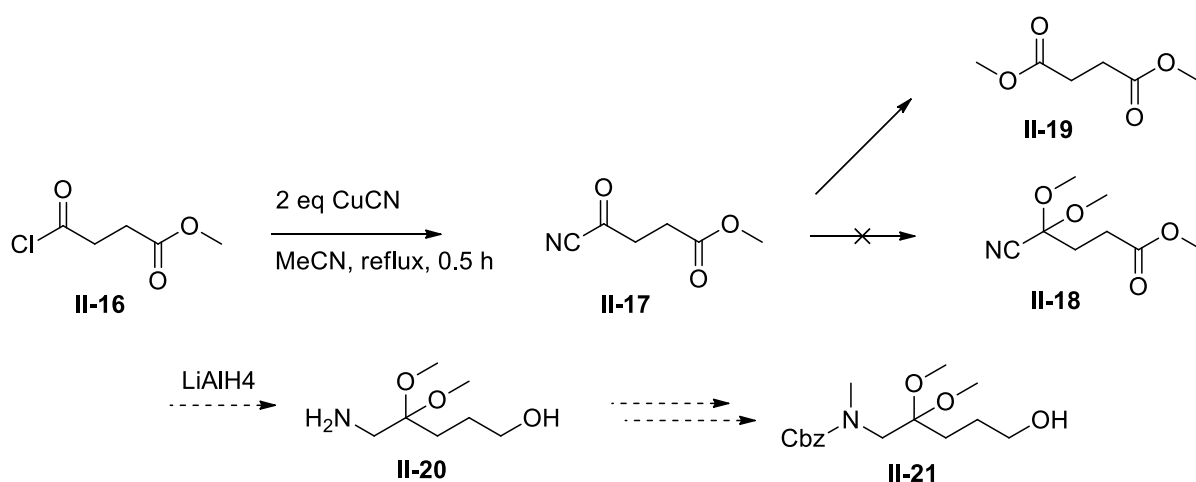


Figure 6.8. Synthèse inspirée de l'acide  $\delta$ -aminolévulinique.

### 3.4. Synthèse à partir du chlorure de 4-chlorobutyryle

Nous avons ensuite envisagé de tirer parti de la réaction de Wissner, rencontrée lors des essais d'obtention d'hydroxy-cétone dans le projet inhibiteur (p. 44). Cette méthode permet l'introduction d'un carbone supplémentaire portant une fonction hydroxyle. Du fait des conditions drastiques imposées lors de cette réaction, nous avons choisi de la réaliser avant l'introduction de la fonction amine. La réaction de Wissner appliquée au chlorure de 4-chlorobutyryle permet d'obtenir l'hydroxy-cétone correspondante avec d'excellents rendements (92%).

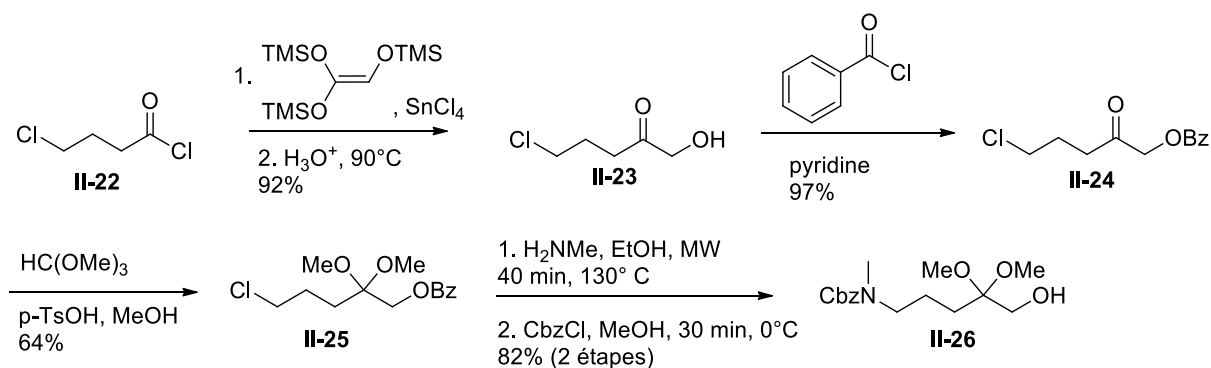


Figure 6.9. Synthèse à partir du chlorure de 4-chlorobutyryle.

Il faut ensuite protéger la cétone afin de pouvoir introduire l'amine. L'acétalisation directe se révèle impossible à réaliser sans protéger préalablement la fonction alcool terminale. Celle-ci est donc protégée sous forme d'un ester benzoylique avec un rendement quasi quantitatif (97%). L'acétal peut ensuite être obtenu par des conditions classiques avec encore une fois d'excellents rendements. Il est alors possible d'effectuer l'introduction de l'amine par substitution nucléophile. Pour faciliter cette réaction, nous avons eu recours à l'utilisation d'un appareil à micro-ondes. Il s'est avéré que dans les conditions nécessaires à la conversion complète (20 eq. de méthylamine dans l'éthanol à  $130^\circ\text{C}$ ), l'amidation de l'ester prenait lieu. Ne souhaitant pas purifier par chromatographie une amine secondaire, nous avons réalisé sa protection par un groupement Cbz avant de procéder à la séparation du monomère ainsi obtenu et de l'amide benzoylique. Malheureusement, les deux produits ont des migrations similaires et leur séparation, bien que réalisable, est très coûteuse en solvants et en temps.

Nous avons donc mis au point une synthèse très efficace du point de vue des rendements (rendement total de 47 % pour 5 étapes) mais nécessitant de préparer le réactif de Wissner ce qui est compliqué et assez long (manipulation de centaines de mL de  $\text{BuLi}$ ). De plus, la purification finale pose des problèmes lorsque l'on augmente l'échelle de la réaction.

### 3.5. Synthèse à partir de la $\beta$ -valérolactone

Nous avons ensuite envisagé une autre protection pour la fonction cétone, ou plutôt une autre forme cachée comme la double liaison  $\text{C}=\text{C}$ . Ce type de liaison est en effet connu pour la possibilité de procéder à leur ouverture oxydante par ozonolyse. On peut donc essayer de synthétiser la molécule ci-après (Figure 6.10). Le groupement de gauche peut faire penser à la forme réduite d'une acroléine et l'amine de droite pourrait être introduite par substitution nucléophile à partir d'un dérivé électrophile, par amination réductrice ou par amidation suivie d'une réduction.

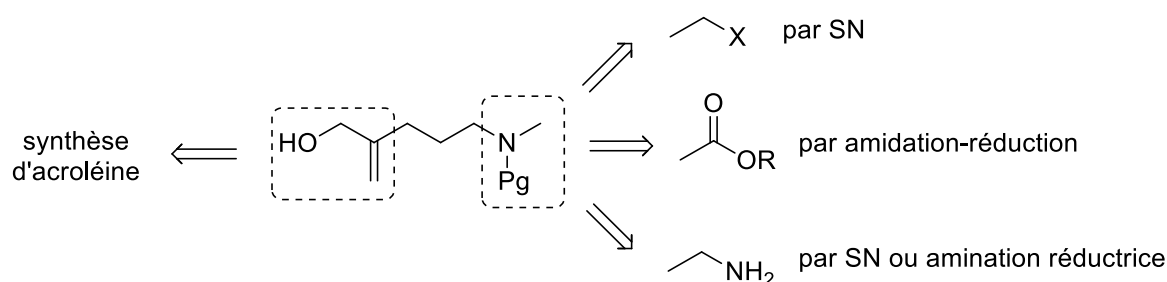
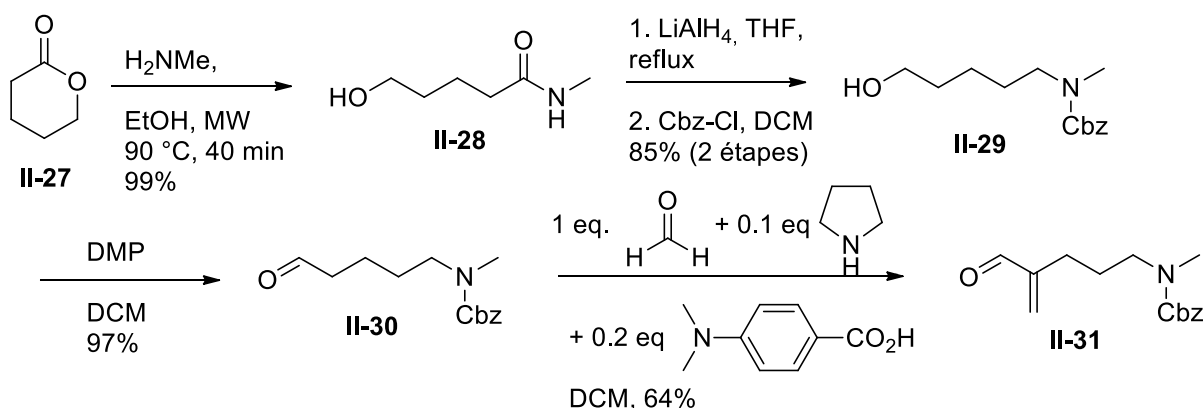


Figure 6.10. Proposition de monomère et son analyse rétrosynthétique.

Les acroléines substituées en  $\alpha$  sont des dérivés utilisés en synthèse car elles peuvent être engagées dans de nombreuses transformations comme une addition nucléophile, une réaction de Baylis-Hillman ou une réaction de Diels-Alder entre autres. De nombreuses réactions ont été mises au point pour parvenir à produire ces composés. Ces composés sont obtenus par condensation de formaldéhyde en  $\alpha$  d'autres aldéhydes. Malheureusement, ces réactions nécessitent généralement des conditions de pression non applicables à la synthèse en laboratoire et la présence de catalyseurs amines et acides. Récemment, une synthèse d' $\alpha$ -méthylénation directe en utilisant des conditions douces a été développée, que nous avons retenue pour former notre terminaison acroléine.<sup>168,169</sup>

Nous avons choisi de partir de la valérolactone, en l'ouvrant par amidation afin d'introduire directement l'amine. Encore une fois, nous avons recours à l'appareil à micro-ondes pour accélérer la réaction (Figure 6.11). L'amide obtenu, nous avons procédé à sa réduction totale, puis sans isoler l'amine, nous l'avons protégée à l'aide d'un groupement Cbz. L'alcool a alors été oxydé en aldéhyde grâce à l'utilisation du réactif de Dess-Martin (l'utilisation d'IBX, du réactif de Jones ou de la réaction de Swern ayant donné de moins bon rendement).

Figure 6.11. Synthèse à partir de la  $\beta$ -valérolactone.

La dernière réaction consiste à former la terminaison acroléine grâce à la réaction décrite par Erkkila *et al.*<sup>168,169</sup> Cette réaction de condensation du formaldéhyde sur l'aldéhyde **II-30** se réalise en présence d'une amine et d'un acide en quantité catalytique. L'acroléine **II-31** est ainsi obtenue en 5 étapes à partir de valérolactone dans de très bons rendements (52%).



### 3.6. Synthèse à partir de l'oxopimelate d'éthyle

En parallèle des tentatives de synthèse d'un monomère à cinq carbones, nous avons également exploré la piste d'un monomère à sept carbones. Parmi la base de données des molécules à bas prix, nous avons isolé l'oxopimelate de diéthyle puisqu'elle possède deux groupements carboxylates pouvant mener d'une part à une amine, par amidation puis réduction, et de l'autre à un alcool primaire par réduction, puisqu'elle présente déjà une fonction cétone à la bonne position (Figure 6.12). Toute la difficulté réside dans la dissymétrisation de la molécule.

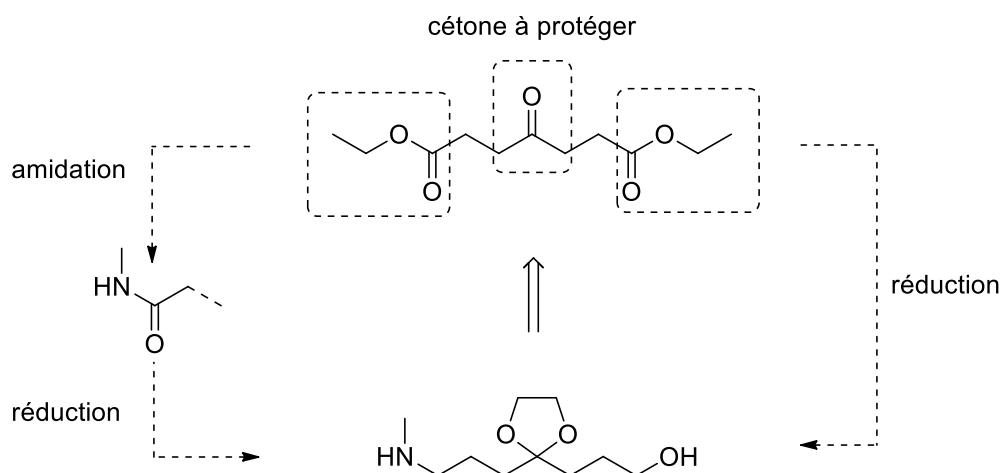


Figure 6.12. Proposition de monomère à sept carbones et son analyse rétrosynthétique.

Avant tout chose, il se révèle nécessaire de protéger la cétone afin qu'elle ne perturbe, ni ne réagisse lors des étapes intermédiaires ou les étapes de couplages. Contrairement au monomère à cinq carbones, on peut considérer ici la cétone comme une fonction totalement indépendante des autres fonctions. On peut donc supposer que la déprotection ne posera pas de soucis et qu'on peut revenir vers une protection plus stable d'un acétal cyclique. Malheureusement on ne peut pas procéder à une protection directe car les conditions sont similaires à celles de la trans-estérification, ce qui mènerait à une polymérisation. Nous avons donc procédé à la formation de l'acétal acyclique en effectuant dans le même temps une trans-estérification non désirée mais non problématique puis à une trans-acétalisation (Figure 6.13).<sup>170</sup>

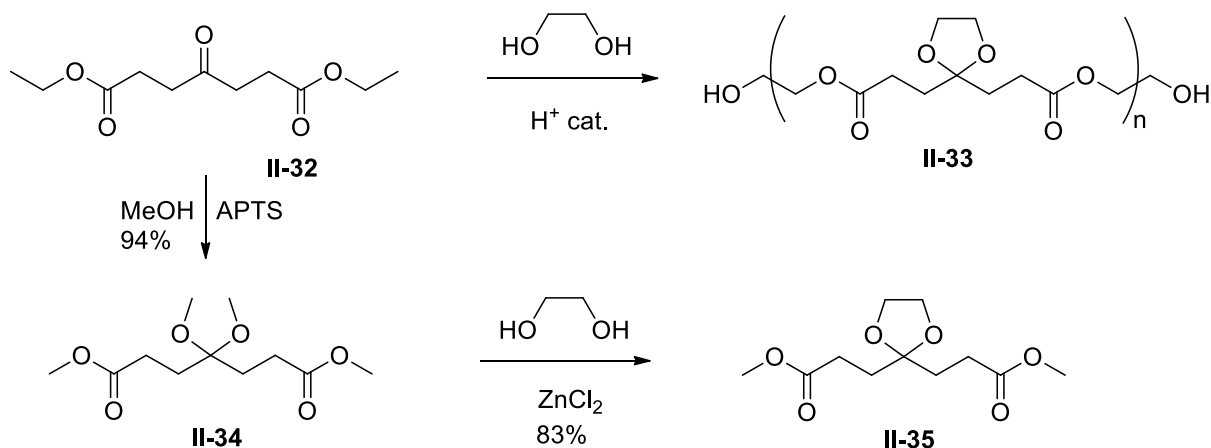


Figure 6.13. Protection de la fonction cétone en deux temps.

Il a ensuite fallu mettre au point la mono-amidation du diester **II-35**. Pour cela nous avons balayé différentes conditions de réaction, en changeant le solvant de réaction, la température ou la présence d'un catalyseur. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous. Les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide d'un appareil à micro-ondes et en présence d'un catalyseur.

Tableau 6.1. Optimisation de la réaction de mono-amidation.

Entrée	Eq. MeNH <sub>2</sub>	Cat.	Condition	Durée	Proportion		
					réactif	mono-amide	di-amide
<b>1</b>	1	-	THF, rt	12 h	100	0	0
<b>2</b>	1	-	MeOH, MW, 80 °C	20 min	95	5	0
<b>3</b>	1	MeNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	MeOH, MW, 80°C	20 min	57	43	0
<b>4</b>	1	-	EtOH, MW, 100°C	2h	88	12	0
<b>5</b>	1	KCN	MeOH, MW, 90°C	3h	37	63	0
<b>6</b>	1	KCN	MeOH, MW, 90°C	6h	20	70	10

Nous avons retenu une option ne produisant pas de di-amide car les produits amide trainent sur colonne et il est donc difficile de les séparer. De plus, il est possible de réengager le réactif d'une réaction sur l'autre et ainsi d'augmenter le rendement apparent. Une fois le mono-amide mono-ester obtenu, il a suffi de réduire totalement les deux groupements à l'aide de  $\text{LiAlH}_4$  en excès puis de protéger l'amine obtenue avant de purifier sur colonne de silice (Figure 6.14). Le monomère **II-39** peut donc être obtenu à l'échelle multi-gramme avec un rendement total de 26%.

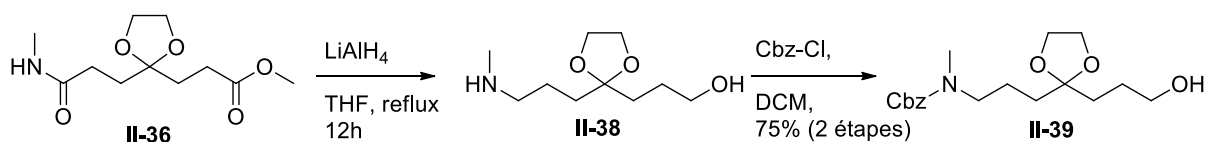


Figure 6.14. Réduction totale du mon-amide **II-36** et protection de l'amine par le groupement Cbz.

En cherchant un peu plus dans la littérature à propos de la synthèse de l'oxopimelate décrite ci-dessous, nous avons tenté de prendre avantage de cette synthèse pour dissymétriser efficacement le composé (Figure 6.15).<sup>171</sup> La synthèse repose sur l'ouverture de l'acide 3-(2-furyl)-acrylique par action d'acide chlorhydrique, généré *in situ* dans l'éthanol par action de chlorure de thionyle. Nous avons donc essayé d'ouvrir l'amide correspondant obtenu par acylation de l'acide puis amidation. Malheureusement, aucun produit n'a pu être isolé.

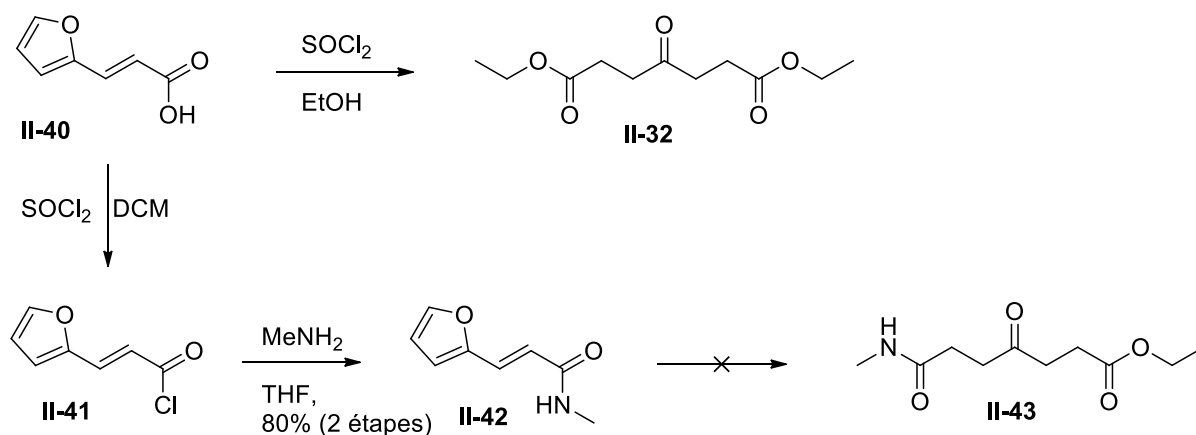


Figure 6.15. Tentative d'accès à **II-43** à partir du précurseur furyl de l'oxopimelate.

#### 4. Test de couplage

Une fois les différents monomères obtenus (un rappel des structures est disponible en Figure 6.16), nous avons procédé aux tests de couplage. Comme évoqué précédemment, nous avons choisi d'utiliser l'amination réductrice car nous avons à notre disposition des terminaisons amines et des terminaisons alcool que nous pouvons oxyder.

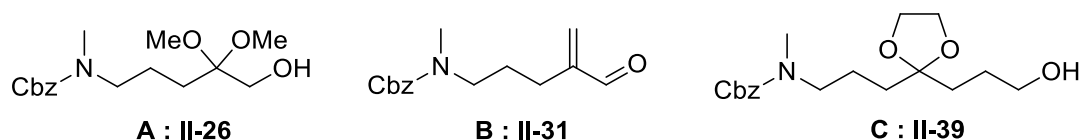


Figure 6.16. Rappel des différents monomères obtenus.

#### 4.1. A partir du monomère A

Dans un premier temps, le monomère doit être activé soit sur sa position *N*-terminale, en libérant l'amine, soit sur sa position *O*-terminale, en oxydant l'alcool en aldéhyde (Figure 6.17). La déprotection du groupement Cbz ne présente pas de difficulté majeure et l'amine libre est obtenue avec un rendement quantitatif sans purification par chromatographie nécessaire. Par contre l'oxydation de l'alcool s'est avéré plus difficile. Les meilleurs rendements (au plus 45 %) ont été obtenus grâce à l'oxydation de Swern. La proximité de l'acétal est probablement à l'origine de la mauvaise efficacité de ces réactions.

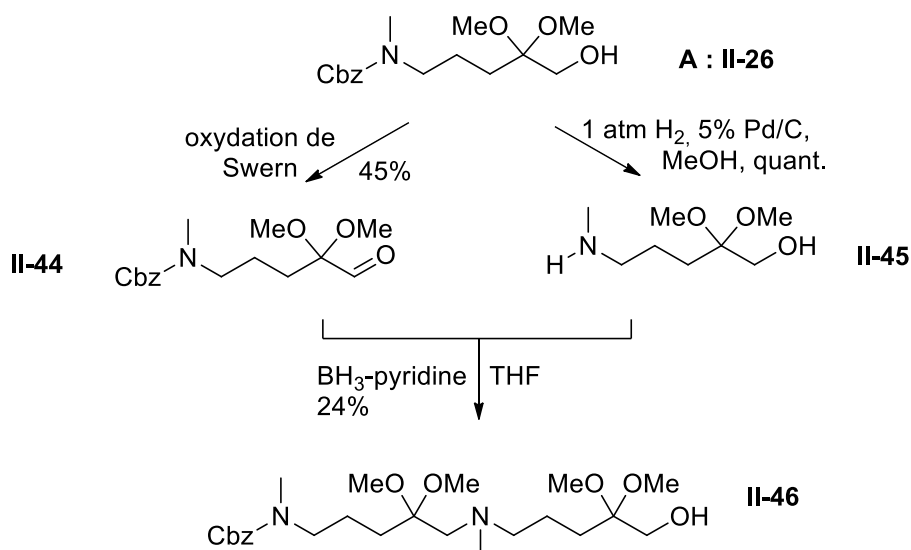


Figure 6.17. Activation du monomère et couplage par amination réductrice.

Le couplage a ensuite été testé avec deux agents d'amination réductrice. L'utilisation de NaCNBH<sub>3</sub> n'a pas donné de résultats satisfaisants avec des rendements de l'ordre de 10 à 15%. Nous avons donc essayé d'autres réactifs. Celui qui a donné les meilleurs rendements est le complexe BH<sub>3</sub>-pyridine, mais toujours avec des rendements inférieurs à 25%. Nous pensons encore que la proximité de l'acétal du centre de la réaction a un effet négatif sur les réactifs d'oxydation et de couplage.

## 4.2. A partir du monomère B

Nous avons ensuite exploré les conditions afin d'effectuer une amination réductrice avec un groupement acroléine. Pour cela, il a tout d'abord fallu préparer d'une part une amine libre et d'autre part un aldéhyde. La synthèse développée, aboutissant directement à la forme aldéhydique **II-31**, il ne restait donc plus qu'à préparer la terminaison amine. Pour cela, il faut commencer par réduire l'aldéhyde pour ne pas avoir de problème de réaction avec la position *O*-terminale, ce qui est réalisé par utilisation de  $\text{NaBH}_4$ . Il faut ensuite déprotéger l'amine. On s'est alors rendu compte que les conditions d'hydrogénolyse attaquaient également le groupement méthylène et il a donc fallu changer de groupement protecteur.

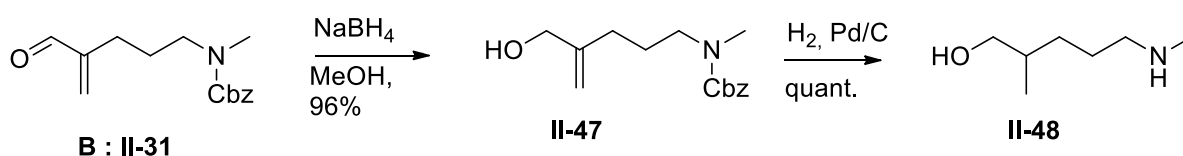


Figure 6.18. Réduction et déprotection du monomère II-31.

Nous avons donc décidé de remplacer le groupement Cbz par un groupement Boc car celui-ci peut être clivé dans des conditions acides ne perturbant pas les groupements méthylènes. La synthèse du monomère Boc-protégé est en tout point similaire avec celle décrite pour le groupement Cbz. La réduction du monomère se réalise encore une fois de manière quantitative et le groupement Boc peut alors être clivé de manière efficace (Figure 6.19)

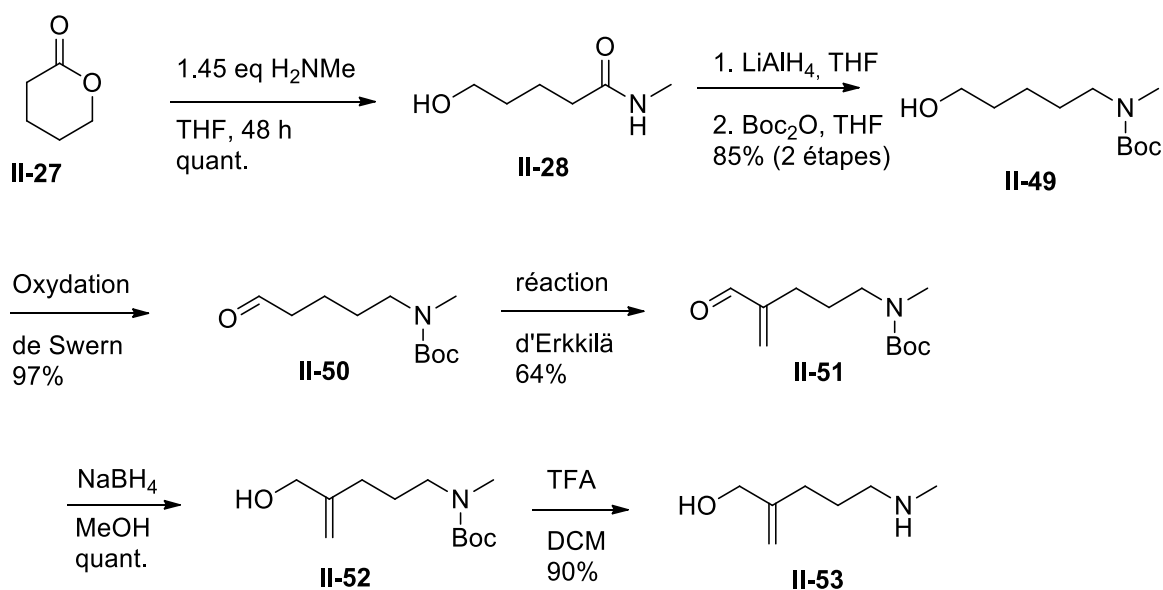


Figure 6.19. Modification de la synthèse pour une protection par le groupement Boc et préparation des monomères *O*-activés et *N*-activés.

Une fois l'amine et l'aldéhyde disponibles, nous avons exploré l'amination réductrice. Malheureusement, l'utilisation de réactifs classiques, comme  $\text{NaCNBH}_3$ , conduit à la réduction du groupement méthylène ainsi qu'à la réduction de l'imine, phénomène observable par LCMS et par RMN (Figure 6.20). Peu de littérature est disponible sur les aminations réductrices mettant en jeu des acroléines. Un article de Lee *et al.* fait état de l'utilisation de chlorure d'indium avec un silane pour réaliser des oxydations d'imes conjuguées.<sup>172</sup> Malheureusement, nous n'avons pas été en moyen de reproduire les résultats décrits et aucun couplage n'a pu être observé.

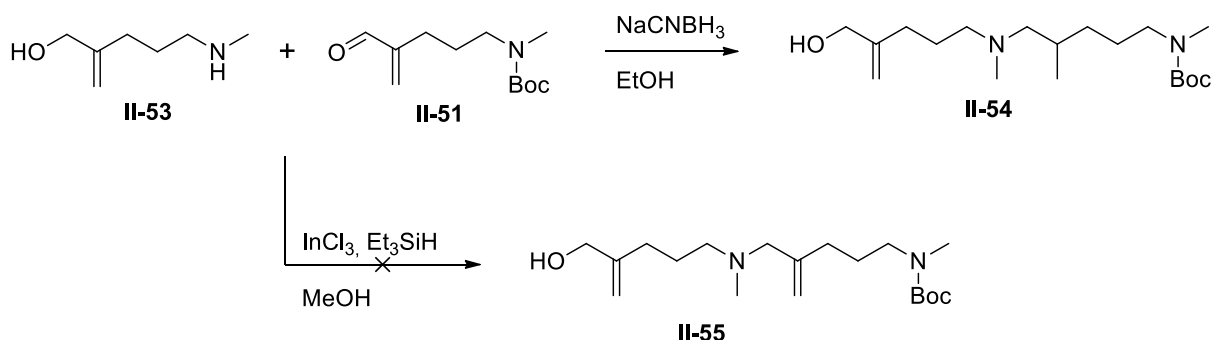


Figure 6.20. Tentatives de couplages.

En conclusion, nous avons à notre disposition un monomère mais aucun moyen de le coupler. Ces travaux vont dans le sens du manque d'exemples dans la littérature sur ce type de couplage. Des travaux d'optimisation de la réaction avec l'indium restent à réaliser sur des molécules modèles avant de retenter le couplage sur les monomères obtenus.

### 4.3. A partir du monomère C

Pour ce dernier monomère, nous avons trois fonctions chimiques bien distinctes et séparées les unes des autres. On peut donc considérer qu'elles réagiront de manière indépendante. La voie de synthèse développée permet d'avoir l'amine déprotégée et ainsi d'avoir notre monomère *N*-activé. Il suffit alors d'oxyder la forme *N*-protégée pour avoir notre monomère *O*-activé. Les oxydations de Swern et par IBX ou le Dess-Martin périodinanone ont été testées et c'est le dernier choix qui a été retenu, de par sa facilité et ses bons rendements. Les essais de couplage ont été suivis par spectrométrie de masse afin de s'assurer de la progression du couplage (Figure 6.21). Le réactif retenu pour le couplage est le  $\text{NaCNBH}_3$ .

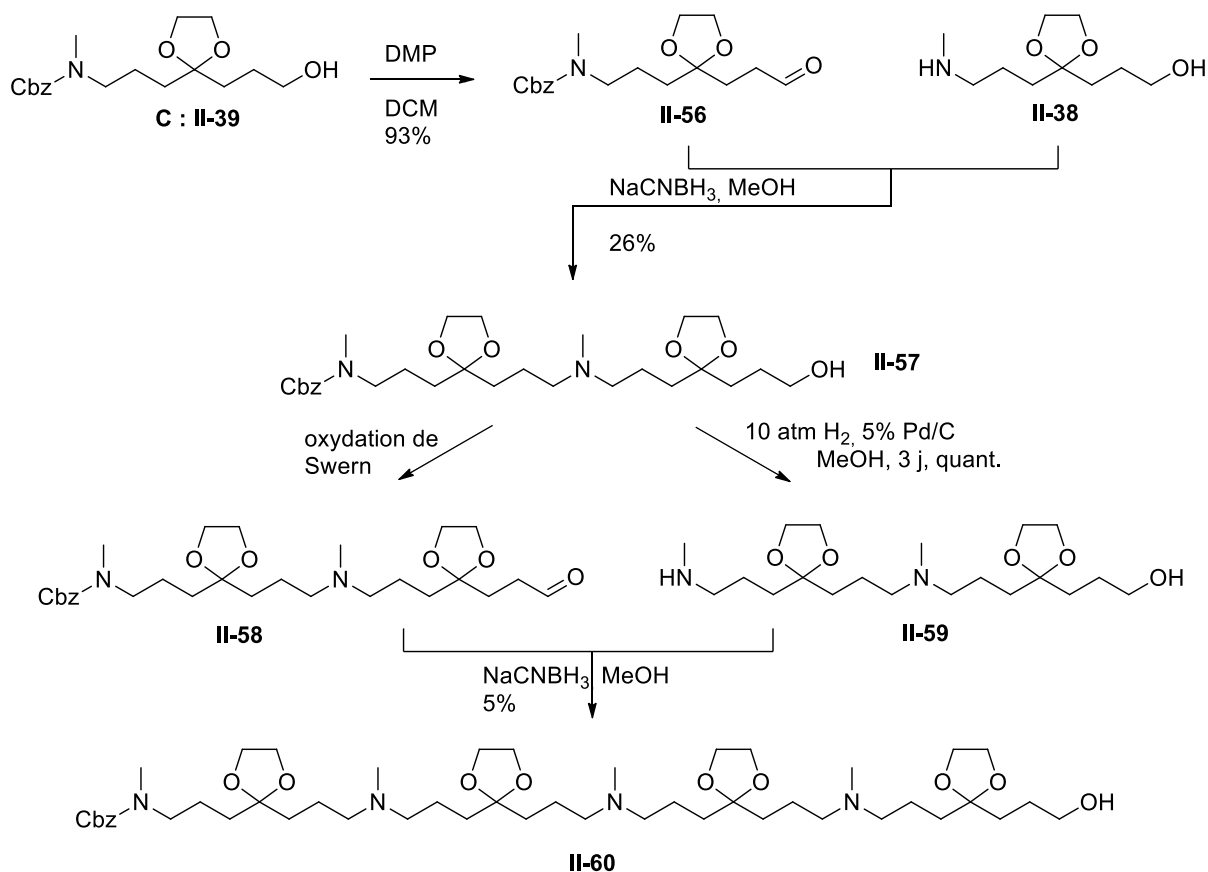


Figure 6.21. Activation du monomère et couplage.

Le suivi par spectrométrie de masse montre une réaction totale après plusieurs heures pour la formation du dimère **II-57**. Malheureusement, la majeure partie du produit est perdue pendant la purification. Nous avons essayé différentes techniques de purification par chromatographie. La silice est à proscrire, ainsi que l'alumine neutre. Nous avons constaté une migration partielle sur alumine basique et sur silice fonctionnalisée par des chaînes C-18. Seule la C-18 permet de séparer le produit des impuretés mais une proportion non négligeable reste coincée dans la cartouche. On obtient ainsi seulement 26% de rendement pour la formation du dimère.

Ce dimère **II-57** a ensuite lui aussi été activé pour réaliser un deuxième couplage et ainsi obtenir un tétramère. Cette fois-ci c'est l'oxydation de Swern qui a produit les meilleurs résultats pour l'oxydation de la *O*-terminaison. Du côté de la terminaison amine, le groupement Cbz n'a pas pu être enlevé à pression ambiante et il a fallu pressuriser la réaction à 10 bars afin de le décrocher totalement. Le couplage a ensuite été réalisé, toujours par action du NaCNBH<sub>3</sub> et sous suivi spectrométrique. Encore une fois, le suivi montre une conversion totale, mais la purification s'est révélée encore plus ardue et le rendement réel s'est retrouvé abaissé à 5% et seuls quelques milligrammes ont pu être isolés.

## 5. Test de déprotection

Afin de prouver la faisabilité de la déprotection des acétals du foldamère, nous l'avons testée sur le monomère comportant une amine tertiaire. Nous avons réalisé une amination réductrice de la fonction amine terminale avant de procéder à la déprotection de l'acétal. La déprotection de l'acétal est quasi instantanée lorsque l'acétal est mis dans une solution d'acétone « mouillée » en présence d'acide chlorhydrique (Figure 6.22). Il est intéressant de noter qu'il est nécessaire d'ajouter plus d'un équivalent d'acide car la protonation de l'amine intervient avant le clivage de l'acétal. De ce fait, les méthodes plus douces, comme l'utilisation de résines acides, ne sont pas révélées efficaces.

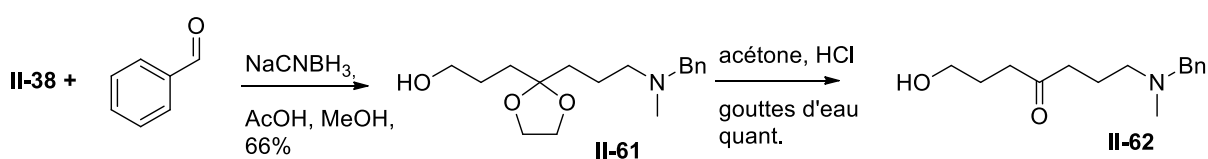


Figure 6.22. Déprotection de l'acétal.

Pour vérifier la présence ou non d'interaction *NCO*, (ici le cycle à 5 n'est probablement pas favorisé), nous avons préparé un échantillon amino-cétone dans du méthanol deutéré et attendu 24 heures avant de réaliser un spectre RMN. Un phénomène étrange est apparu : la disparition des signaux correspondant aux protons en  $\alpha$  du carbonyl ainsi que la disparition des signaux correspondant aux carbones associés (Figure 6.23 et Figure 6.24).

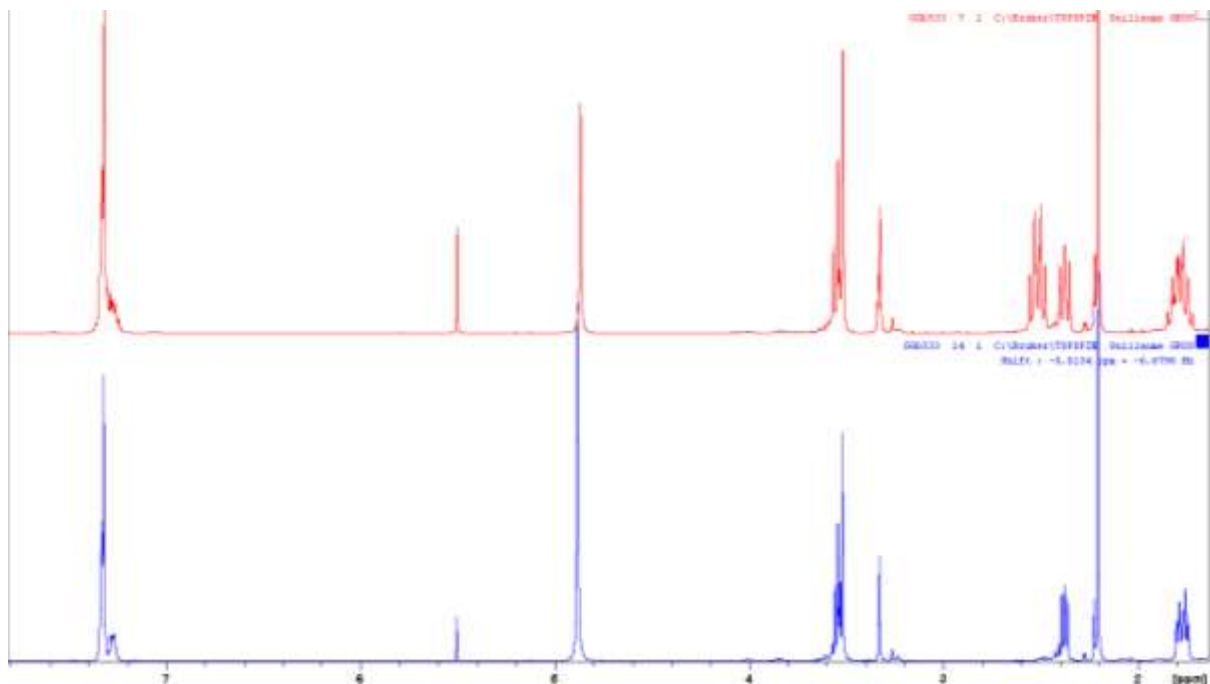


Figure 6.23. Spectre RMN  $^1\text{H}$  de II-62 dans le  $\text{MeOD-}d_4$  après 5 min (en haut) et après 24 h (en bas).



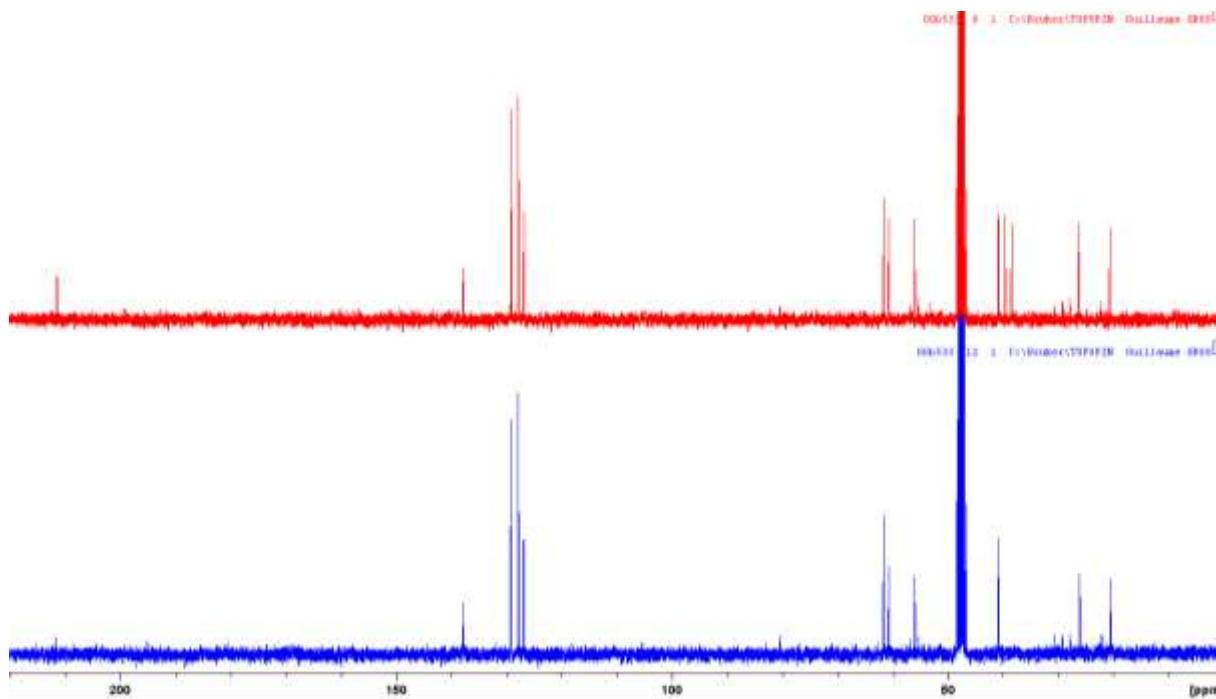


Figure 6.24. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de II-62 dans le  $\text{MeOD-}d_4$  après 5 min (en haut) et après 24 h (en bas).

L'hypothèse la plus probable est qu'on assiste à une deutération progressive des protons en  $\alpha$  du carbonyle ce qui se vérifie par une expérience en RMN du  $^{13}\text{C}$  avec un temps d'acquisition très long (24 h) sur une fenêtre très étroite (6 ppm). On peut observer les deux multiplets du fait du spin de 1 du deuterium aux positions attendues pour les deux carbones (Figure 6.25).

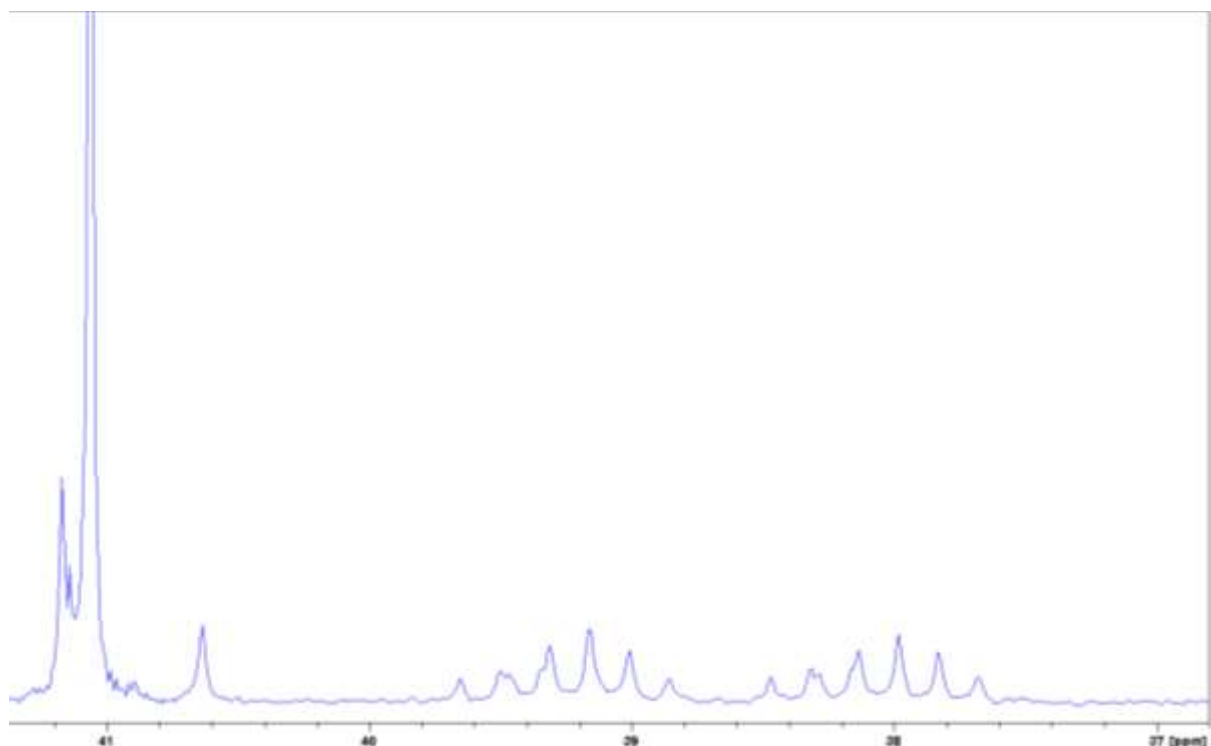


Figure 6.25. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  de II-62 permettant l'observation des deux carbones « disparus ».

Nous n'avons donc pas d'interaction *NCO*, mais un autre phénomène fait son apparition qui risque de nous compliquer la tâche. En effet, dans le cas de molécules plus complexes, la présence d'interaction *NCO* devrait se traduire par un déplacement de ces mêmes signaux qui maintenant disparaissent. Il faudrait donc réaliser des RMN dans des solvants non deutérés. Cela peut être fait grâce à l'utilisation d'un insert avec du solvant deutéré et une irradiation sur la fréquence associée au solvant.

## 6. Conclusion et perspectives : vers la synthèse sur support solide

L'objectif de cette partie de thèse consistait :

- à développer la synthèse d'un nouveau monomère pouvant être oligomérisé de façon efficace et, surtout, pouvant être déprotégé en fin de synthèse pour libérer les groupements cétones ;
- une fois l'oligomère biomimétique d'un nouveau type obtenu, susceptible de se replier en milieux aqueux par formation de plusieurs interactions *NCO*, à étudier l'éventuel repliement par divers techniques et d'essayer de prouver l'existence de multiples interactions *NCO*.

Pour cela, il a d'abord fallu explorer différentes pistes pour obtenir un monomère de façon simple, rapide et efficace. De nombreuses voies ont été tentées et parmi elles, trois ont été retenues pour effectuer des tests de couplage. L'utilisation de l'amination réductrice a permis dans un seul cas de conduire vers une conversion complète des réactifs observée grâce à un suivi en spectrométrie de masse. Malheureusement les polyamines obtenues sont très difficiles à purifier et les rendements finaux s'en trouvent donc fortement affectés.

Une des solutions envisagées est d'utiliser la synthèse sur support solide afin de s'affranchir de purifications intermédiaires et de pouvoir, à terme, moduler la synthèse avec différents résidus sur l'amine tertiaire (Figure 6.26). Cela pourrait permettre, après optimisation, de fabriquer une banque de données de différents oligomères et d'étudier l'influence des groupements portés par l'amine sur un possible repliement. Il existe, pour le moment, différents types de résines adaptées pour la synthèse sur support solide. Actuellement les technologies basées sur les groupements protecteurs Boc et Fmoc sont les plus usitées. Sachant que les conditions de clivage du groupement Boc ne sont pas orthogonales avec celle de clivage de l'acétal, nous avons choisi d'explorer la possibilité d'utiliser la technologie basée sur les groupements Fmoc.

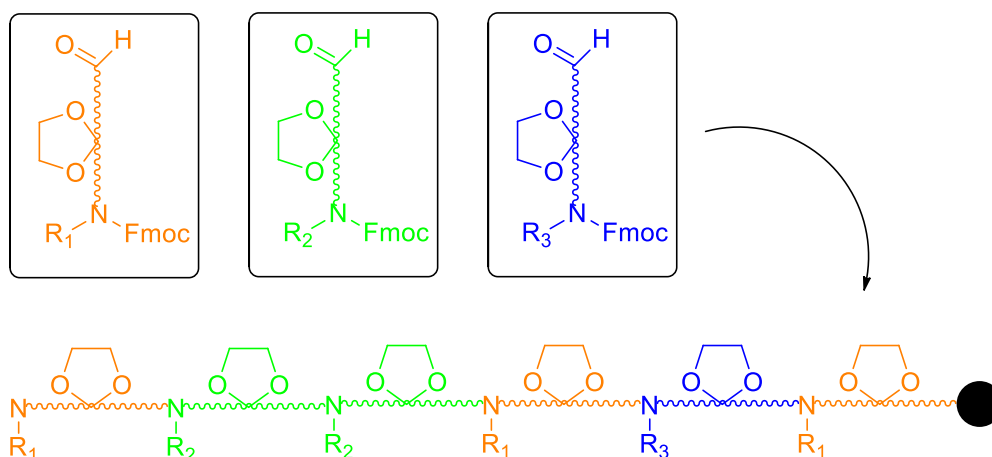


Figure 6.26. Stratégie de couplage par synthèse sur support solide.

Pour cela, nous avons adapté la synthèse afin de pouvoir être compatible avec la synthèse sur support solide (Figure 6.27). Le remplacement du Cbz par le groupement Fmoc ne pose aucune difficulté. Par contre, afin d'attacher notre oligomère sur une résine, il faut que le premier monomère comporte une terminaison acide carboxylique. Cette réaction est effectuée en condition tamponnée pour ne pas cliver l'acétal ni le groupement Fmoc.<sup>173</sup>

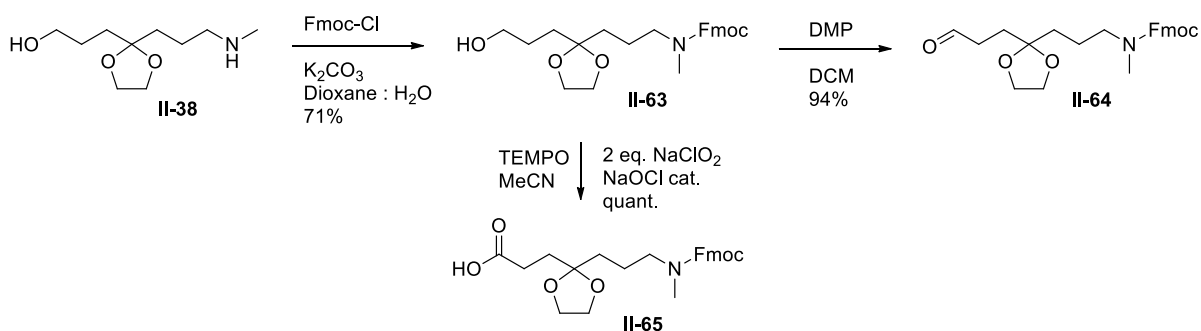


Figure 6.27. Modification de la synthèse du monomère pour accéder à une protection Fmoc et à un résidu acide pour initier la synthèse sur support solide.

La continuation logique de ce travail aurait été de mettre au point la synthèse sur support solide. Ce type de technologie, nouvelle pour le laboratoire, a nécessité l'achat de matériels spécifiques. Du fait de problèmes et délais de livraisons (appareil défectueux devant être remplacé), j'ai travaillé entre-temps sur un troisième sujet (cf. partie III). Du fait des résultats très probant de ce dernier sujet, il a été décidé de mettre le projet de synthèse d'oligomères sur support solide de côté.

Du côté des études de repliements, nous n'avons malheureusement jamais abouti à des objets d'études et nous savons que nous risquons de nous heurter à des problèmes de caractérisation complexe du fait de la deutération naturelle de nos composés.

Il reste donc de très nombreux travaux à effectuer afin de pouvoir, un jour, accéder et étudier un foldamère mettant en jeu plusieurs interactions *NCO*.

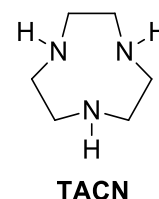
## **Partie III : Développement d'un procédé de synthèse**

Le travail présenté dans cette partie n'était pas prévu dans mon sujet initial de thèse mais a abouti à une avancée majeure pour la synthèse de composés essentiels au groupe de Chimie Bio-Organique dont je fais partie.



## Chapitre 7. Une petite histoire autour de la synthèse et de la dérivatisation du 1,4,7-triazacyclononane (TACN)

Le TACN s'est révélé être une plateforme de choix pour les chimistes de coordination car il possède trois groupements amines coordinants sur lesquels on peut ajouter différents bras coordinants supplémentaires.<sup>174,175</sup> Les complexes métalliques associés ont des applications très diverses comme l'imagerie moléculaire et la catalyse.



On peut citer plus particulièrement l'imagerie PET (complexe de  $^{68}\text{Ga}$  avec des analogues du TRAP), l'imagerie IRM (complexe de Fe avec des analogues du TPTACN), la catalyse (complexe de Mn avec des analogues du MeTACN) (Figure 7.1).<sup>176-178</sup> De très nombreux complexes métalliques ont été préparés avec, entre autres, du Mn (II-V), Fe(II), Fe(III), Ru(II-IV et VI), Co(III), Ga(III), Cu(II) et Zn(II). On retrouve cette classe de composés dans plus d'une centaine de brevets et le champ d'applications ne cesse de croître. On exploite également les propriétés des dérivés du TACN pour l'étude de l'orientation des protéines aux interfaces, dans des modèles de métalloenzymes, dans des clusters moléculaires magnétiques et dans le transport de métaux à fins thérapeutiques ou diagnostiques.

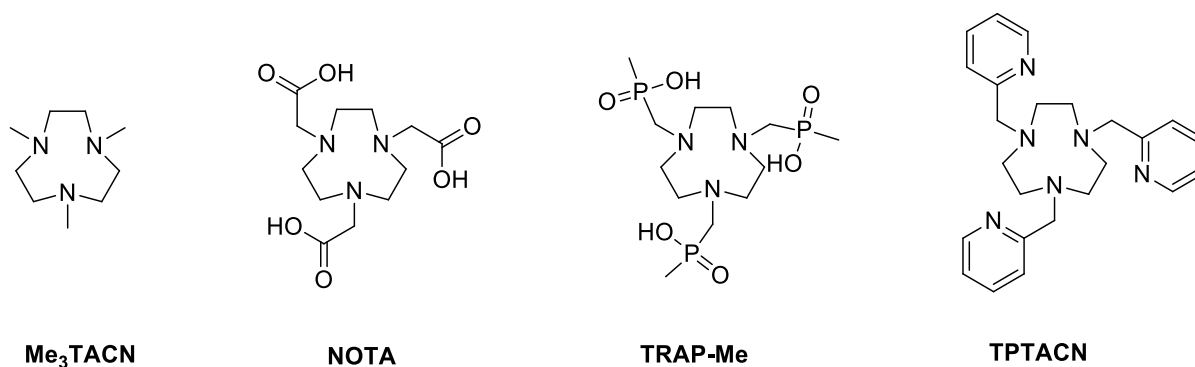


Figure 7.1. Dérivés « classiques » de TACN.

Si l'on s'intéresse de plus près aux agents à fin médical, l'attention est désormais portée vers les agents plurimodaux permettant de faire à la fois du ciblage et de l'imagerie ou encore à la fois du ciblage et de la thérapie. Pour cela, il a été nécessaire de développer des agents sur lesquels pouvaient être greffées d'autres molécules d'intérêts. On trouve deux grandes stratégies pour la dérivatisation de

la plateforme TACN : soit une fonctionnalisation sur un carbone du macrocycle soit une fonctionnalisation dissymétrique sur les azotes du macrocycles (Figure 7.2).

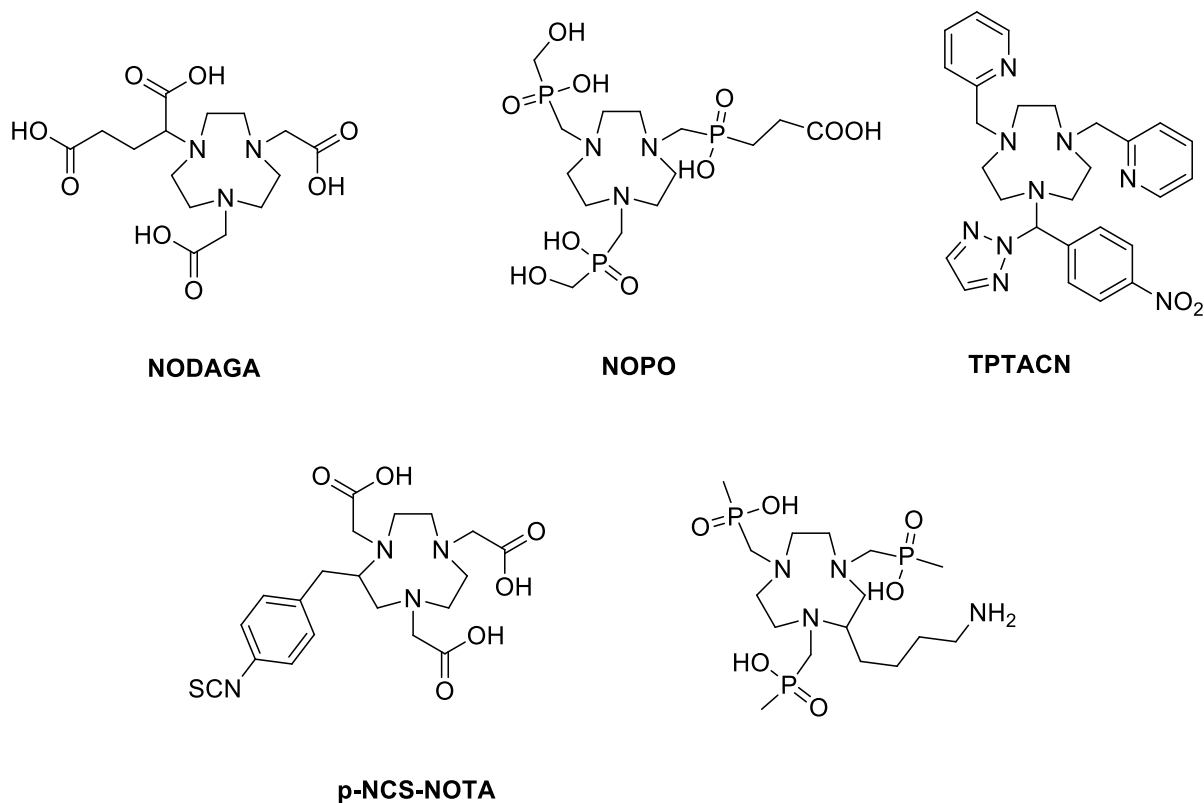


Figure 7.2. Exemples de TACNs présentant un bras fonctionnalisable.

Malgré l'intérêt notable donné aux dérivés de TACNs, peu de méthodologies fiables sont décrites pour accéder à de telles plateformes de façon simple et efficace. Pour l'instant, les accès synthétiques reposent sur l'alkylation contrôlée du TACN nu, qu'il faut soit acheter (de l'ordre de la centaine d'euros pour un gramme de TACN 3HCl), soit fabriquer (20-50 g pour 7 à 10 jours de travail). Nous allons rappeler ici les différentes techniques de fabrication et de dérivatisation du TACN.

## 1. Préparation de la plateforme TACN

Jusqu'à très récemment, l'unique voie de synthèse du TACN était basée sur la procédure d'obtention de polyamines macrocycliques développée en 1974 par Richman et Atkins à partir de diéthylènetriamine (DETA) et d'éthylène glycol.<sup>179</sup> Cette méthode repose sur la réaction entre un sel de bis-*p*-toluènesulfonamide et un composé bis-tosylé ou mésylé dans du DMF anhydre (Figure 7.3).

Les groupements tosyloxy contribuent à la bonne pré-organisation des intermédiaires réactionnels par un effet de type Thorpe-Ingold et favorisent ainsi la cyclisation intramoléculaire.

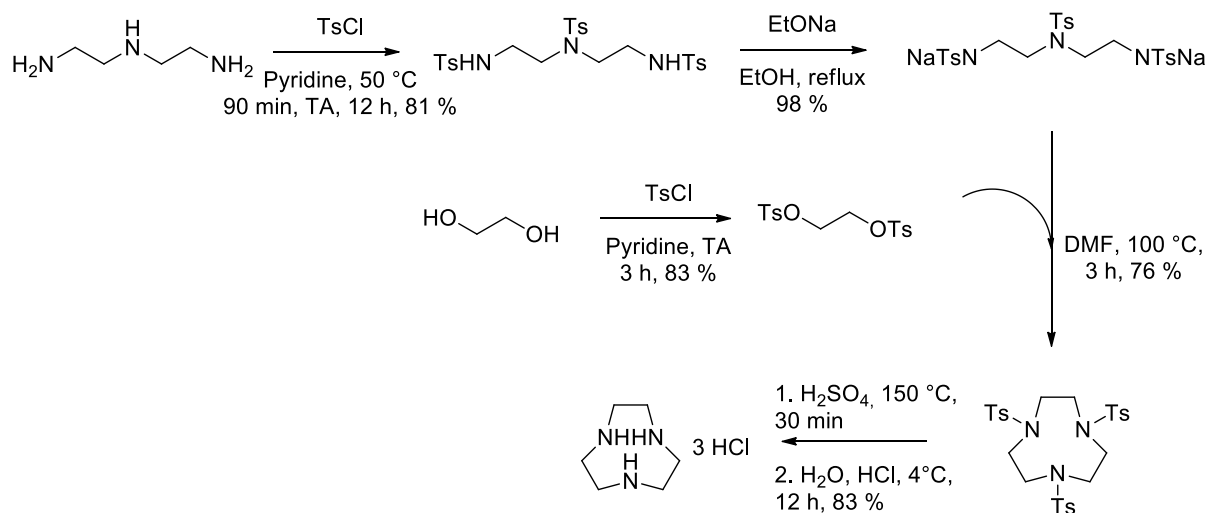


Figure 7.3. Synthèse du TACN 3.HCl de Richman et Atkins

Cette méthode est cependant peu atome-économique, demande de longs temps de réaction et requiert une étape finale dans de l'acide sulfurique concentré à haute température qui limite son application à l'échelle industrielle. Plusieurs modifications mineures ont été explorées comme, l'utilisation de groupements proches des tosyloxy ou l'utilisation d'acide hydrobromique pour la déprotection de ces derniers.<sup>180-182</sup>

Très récemment, lors d'une présentation du Professeur Franck Denat, directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, nous a été présentés des résultats concernant une nouvelle approche pour la synthèse du TACN. Bien qu'à l'époque, aucune trace de cette synthèse n'apparaisse dans la littérature, la description de la synthèse était disponible dans la thèse (disponible en ligne) de Pauline Desogère et semblait avoir fait l'objet d'un brevet.<sup>183</sup> Le brevet est depuis peu disponible.<sup>184</sup> La synthèse repose sur la formation d'un bicyclic polyazoté qui, une fois alkylé, peut être ouvert par réduction pour donner sélectivement le macrocycle TACN trois fois substitué (Figure 7.4).



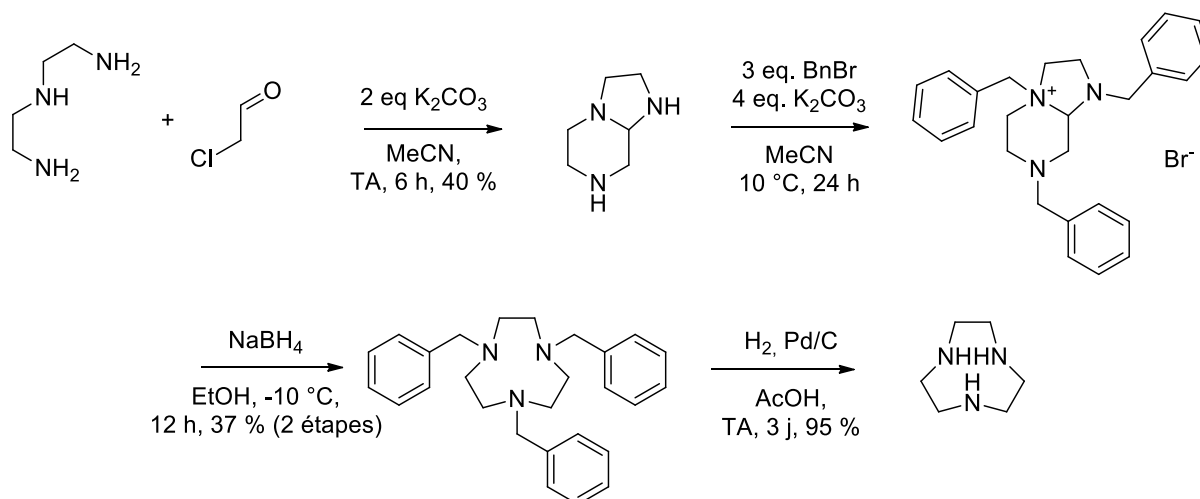


Figure 7.4. Synthèse du TACN présentée dans la thèse de Pauline Desogère

Afin de pouvoir alkyler le bicyclic et de pouvoir déprotéger le TACN par la suite, leur attention s'est focalisée sur l'utilisation du groupement benzyle qui peut être enlevé par hydrogénation catalytique. Cette synthèse a le mérite de s'affranchir des groupements tosyloxy mais seulement pour les remplacer par des benzyles ce qui rend la synthèse tout aussi peu atome-économique.

## 2. N-alkylations

Nous nous focaliserons ici sur la mono et la di-alkylation qui présentent un défi synthétique de taille puisqu'il existe trois amines identiques à substituer. L'alkylation complète se réalise simplement par ajout d'un excès d'agent alkylant ou équivalent et ne comporte pas d'enjeux particuliers.

### 2.1. Contrôle de l'alkylation

On pourrait penser que la méthode la plus simple serait d'ajouter seulement deux équivalents d'agents alkylants pour chaque équivalent de TACN. Malheureusement, on obtient généralement un mélange des trois degrés de substitution et leur séparation est très complexe voire dans certains cas impossible (Figure 7.5). Quelques méthodes ont cependant vu le jour avec des contrôles précis du pH de la solution et une addition contrôlée de l'ajout d'agent alkylant sur des périodes très longues.<sup>185</sup> Et

les résultats obtenus montrent dans le meilleur des cas un mélange de produits di et tri-alkylés qu'il faut séparer.

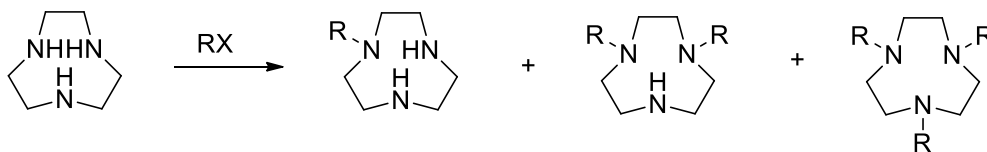


Figure 7.5. Alkylation directe du TACN.

Le peu de citations des quelques articles relatant ces alkylations directes montrent la grande difficulté à reproduire ces résultats.

## 2.2. Par formation d'un intermédiaire orthoamide

Une autre technique très usitée s'appuie sur l'introduction d'un unique groupement formyl caché sous la forme tricyclique orthoamide.<sup>186</sup> Cet orthoamide est formé par réaction du TACN avec le diméthylacétal diméthylformamide (Figure 7.6). Cette méthode permet la synthèse de composés monosubstitués et une adaptation de cette dernière permet également d'obtenir des composés disubstitués.<sup>187</sup>

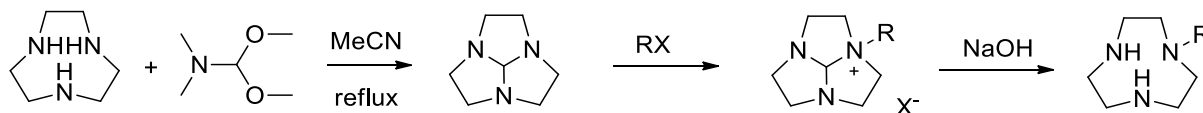


Figure 7.6. Monosubstitution par formation d'un intermédiaire orthoamide.

### 2.3. Par formation d'un intermédiaire aminor

Une étude plus récente réalisée par Tripier *et al.* présente l'utilisation d'un aminor intermédiaire afin de bloquer deux des trois amines et ainsi permettre une monosubstitution directe (Figure 7.7).<sup>188</sup>

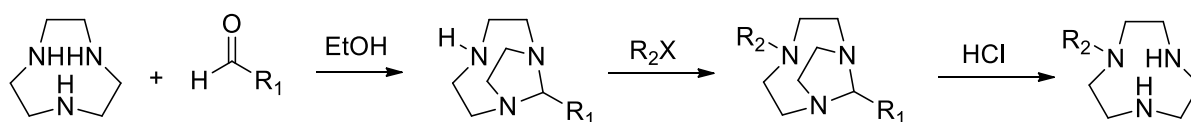


Figure 7.7. Monosubstitution par formation d'un intermédiaire aminor.

### 2.4. Par mono ou diprotection

Des méthodes plus classiques ont également vu le jour comme la mono ou di-protection par tosylation,<sup>189</sup> carbamation,<sup>190</sup> ou sulfomethylation<sup>191</sup> par contrôle du pH. Nous allons présenter ci-dessous la méthode par tosylation qui présente l'avantage de partir du précurseur du TACN mais qui empêche l'introduction de groupements sensibles aux conditions drastiques de déprotection des tosyloxy (Figure 7.8).

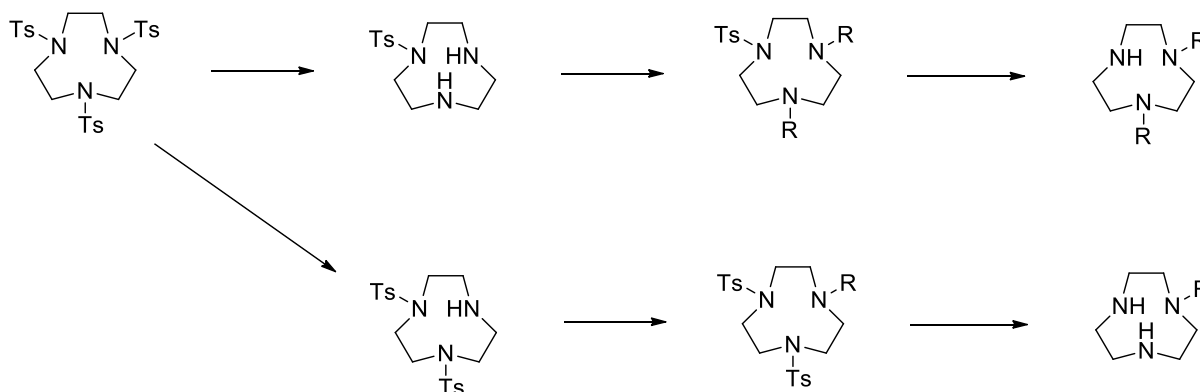


Figure 7.8. Stratégie de mono- ou bi-substitution du TACN par mono- ou di-protection par tosylation.

Plus récemment a été mise au point une di-protection du TACN par le groupement Moz (*p*-methoxyCbz) qui permet l'obtention de TACNs mono ou di-substitués (Figure 7.9).<sup>192</sup> Cette fois, c'est la gêne stérique qui permet de limiter la substitution.

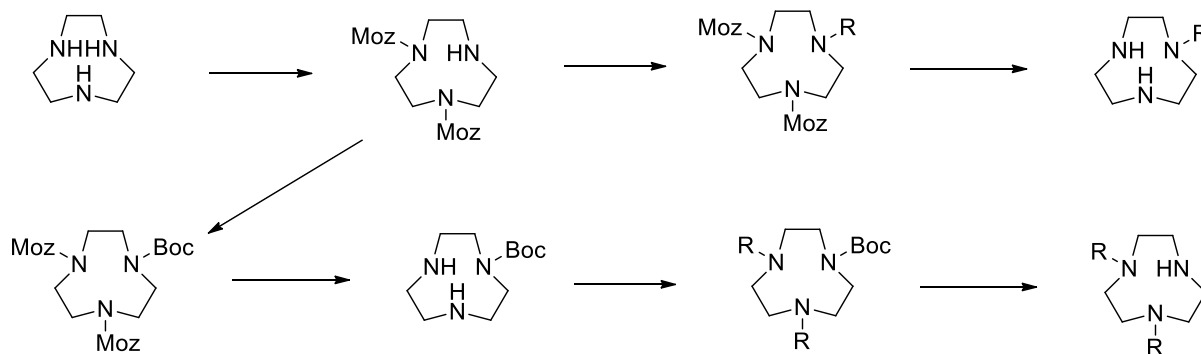


Figure 7.9. Stratégie de mono- ou bi-substitution du TACN par di-protection par le groupement Moz.

On peut donc remarquer que de nombreuses techniques ont été mises au point mais que, malheureusement, toutes sont très coûteuses en temps et présentent de faibles rendements.

### 3. C-alkylations

#### 3.1. Par la synthèse de Richman et Atkins

Une autre technique radicalement différente consiste à ajouter des substituants sur les carbones du macrocycle. Les premières synthèses se sont appuyées sur une pré-fonctionnalisation des synthons utilisés dans le couplage de Richman et Atkins (Figure 7.10).<sup>193-196</sup> Pour cela, il faut préparer soit l'éthylène glycol soit la DETA portant un substituant. Ces synthèses sont généralement difficiles et les substituants doivent être résistants aux conditions de déprotection des groupements tosyloxy, *i.e.* reflux dans l'acide sulfurique concentré, ce qui limite grandement la gamme des substituants.

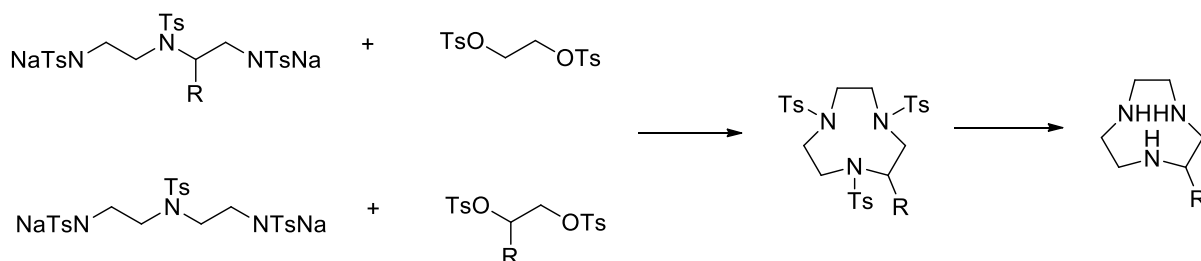


Figure 7.10. Stratégie de C-alkylations par la méthode de Richman et Atkins.

### 3.2. Par alkylation d'un sel d'imidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium

En 2006, Koek *et al.* décrivent un procédé de synthèse original permettant la fonctionnalisation d'un atome de carbone du cycle TACN en partant du Me<sub>3</sub>TACN (Figure 7.11).<sup>197</sup> Le Me<sub>3</sub>TACN est oxydé par du *N*-bromosuccinimide (NBS) pour conduire à l'intermédiaire bicyclique. Le carbone engagé dans la liaison aminal se retrouve fortement électrophile et peut alors réagir avec un nucléophile tel que le cyanure pour ré-ouvrir la structure bicyclique et reformer le cycle TACN. Le groupement nitrile, ainsi introduit, peut alors être réduit par application d'hydrure d'aluminium et de lithium pour donner une fonction amine pouvant être ultérieurement fonctionnalisée si nécessaire.

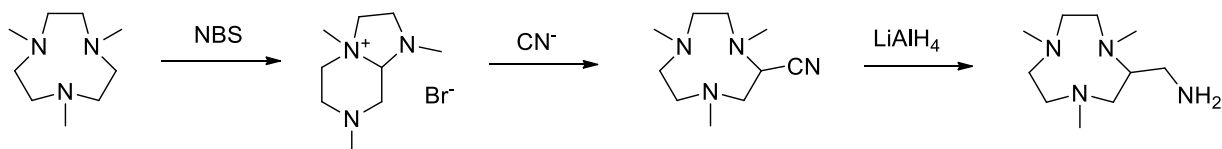


Figure 7.11. Premier exemple du bicycle imidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium.

Ce sont ces travaux qui mentionnent pour la première fois l'intermédiaire bicyclique pour la synthèse de TACNs C-fonctionnalisés. L'équipe du Pr. Denat a tiré profit de l'existence de cet intermédiaire pour développer la synthèse du TACN nu présentée précédemment ainsi que de TACNs C-fonctionnalisés basée sur l'attaque d'un nucléophile sur ce bicycle (Figure 7.12).

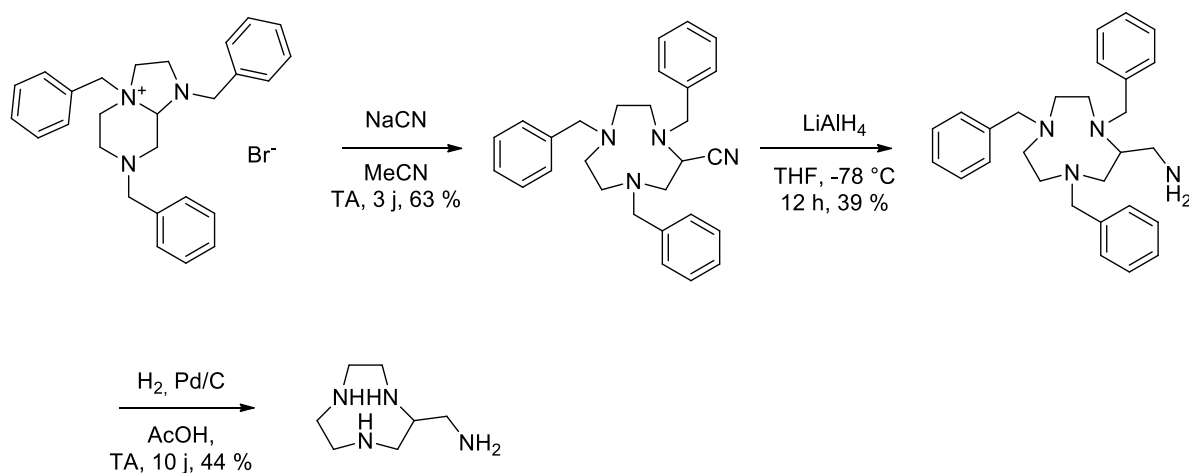


Figure 7.12. Accès à des TACN C-substitués développé par l'équipe de Denat.

Il faut donc retenir que la fonctionnalisation asymétrique du macrocycle TACN peut se faire de deux manières, soit par fonctionnalisation sur un atome de carbone soit sur un atome d'azote.

Cependant chacune des deux voies présente de grosses contraintes de synthèses. De plus, la C-fonctionnalisation présente des problèmes de caractérisations du fait de la création d'un site chiral.



## Chapitre 8. Mise au point d'un accès direct à des TACNs présentant une substitution 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub>

Nous venons de voir qu'il existe de multiples façons de dissymétriser la plateforme TACN mais que la plupart de ces méthodes repose sur la synthèse préalable ou l'achat du TACN nu. Seule la synthèse du groupe de Pr. Denat propose une nouvelle approche par l'intermédiaire d'un bicyclic. Ce bicyclic présente trois amines différentes : une amine secondaire « classique », une amine secondaire engagée dans la liaison aminal et une amine tertiaire engagée dans la liaison aminal. Pour obtenir des produits dissymétriques à partir de ce bicyclic, une double protection grâce au groupement Boc a été tentée (Figure 8.1).<sup>184</sup> La troisième position a ensuite été alkylée mais le macrocycle n'a pas pu être obtenu.

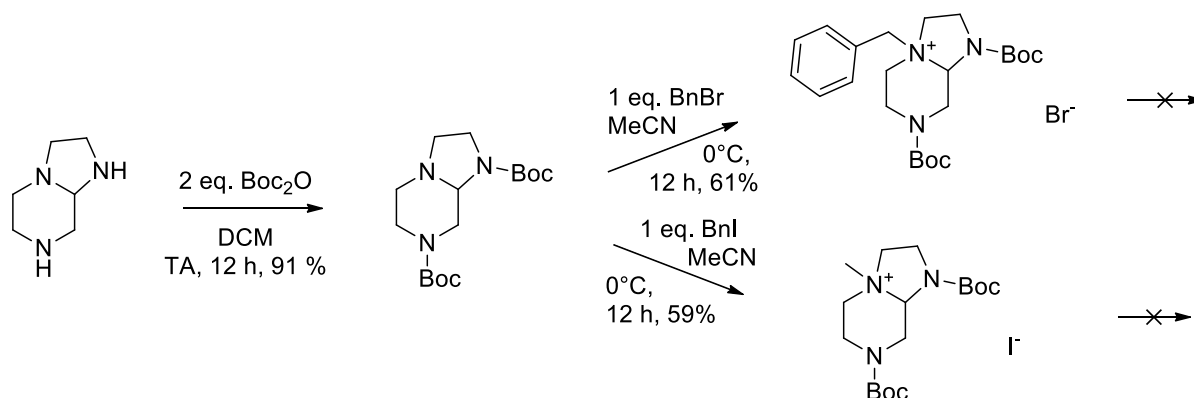


Figure 8.1. Tentatives d'accès à des TACN mono-substitué par Denat.

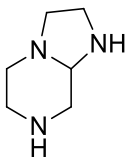
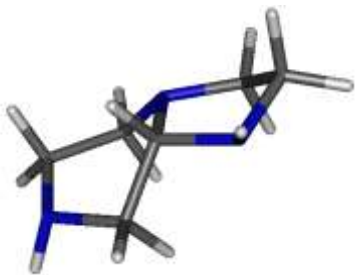
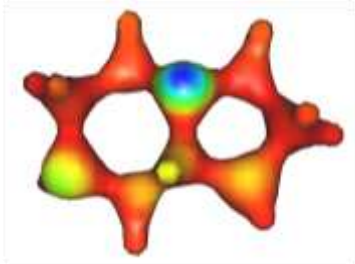
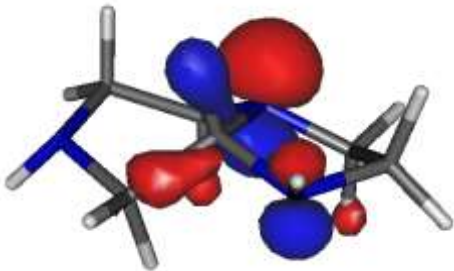
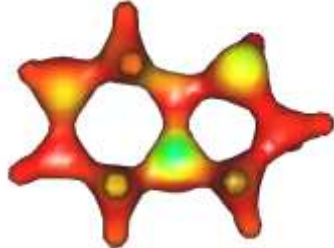
Dans cette continuité, nous avons tenté de préparer des TACNs dissymétrisés sans avoir à synthétiser et isoler le TACN au préalable.



## 1. Etude théorique du bicyclic et analyse rétrosynthétique

Afin d'en comprendre un peu plus sur le comportement des différents groupements amines, nous avons tout d'abord décidé d'analyser le bicyclic nu grâce au logiciel Gabedit avec l'aide de Raymond Gruber, un collègue doctorant en chimie théorique. Nous avons modélisé le bicyclic et optimisé sa structure puis nous avons tracé la surface représentant la susceptibilité électrophile. Les résultats obtenus sont affichés ci-dessous.

Tableau 8.1. Représentation de la structure optimisée du bicyclic nu, de sa HO et de sa susceptibilité électrophile.

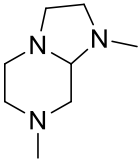

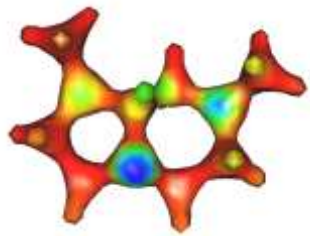
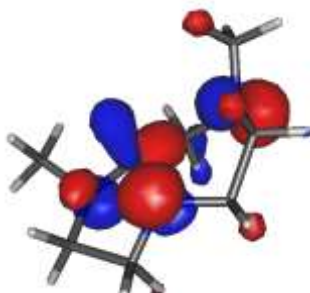
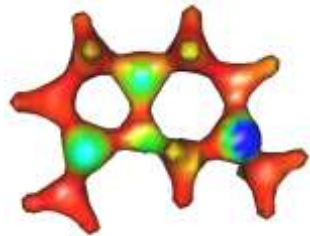
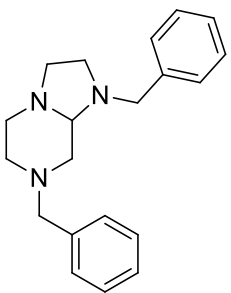

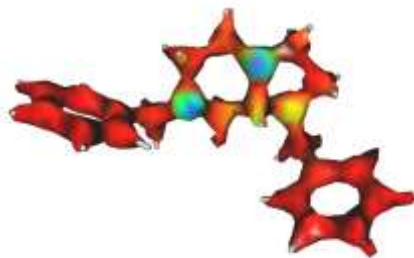
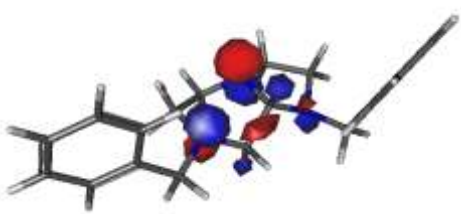
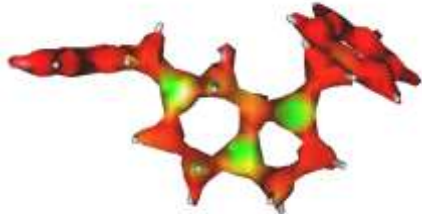
	<p>dessus</p>  <p>dessous</p>	 <p>Vu de dessus</p>
	 <p>HO</p>	 <p>Vu de dessous</p>

On peut remarquer que les trois amines présentent un doublet non liant bien dégagé et, par conséquent, qu'il ne devrait pas y avoir de gêne stérique particulière dans l'approche d'un électrophile. En revanche, la HO ainsi que la surface de susceptibilité électrophile montrent une prédisposition pour une attaque électrophile sur l'amine tertiaire engagée dans la liaison aminale. On peut donc se demander pourquoi le produit di-Boc a pu être isolé. Cela est probablement dû au fait qu'il est impossible de former un ammonium protégé par un groupement Boc. Néanmoins, dans le cas d'halogénure d'alkyle, il est possible que l'alkylation se fasse d'abord sur l'amine tertiaire rendant difficile l'isolation d'un produit mono ou di-alkylé.

Nous avons ensuite voulu vérifier que le bicyclic di-substitué pouvait bien être alkylé sur la troisième position. Par soucis de simplicités de calculs, nous avons modélisé les effets des

groupements alkyles sur la susceptibilité électrophile à l'aide de méthyles. Nous avons ensuite réalisé une modélisation à l'aide des benzyles pour modéliser l'effet de la gêne stérique et de groupements aromatiques. Les résultats sont affichés ci-dessous.

**Tableau 8.2. Représentation des structures optimisées, des HO et des susceptibilités électrophiles de deux bicycles bi-substitués.**

	<p>dessus</p>  <p>dessous</p>	 <p>Vu de dessus</p>
	 <p>HO</p>	 <p>Vu de dessous</p>
	<p>dessus</p>  <p>dessous</p>	 <p>Vu de dessus</p>
	 <p>HO</p>	 <p>Vu de dessous</p>

On peut remarquer que, dans le cas des substituants méthyles, les amines conservent leur caractère nucléophile et que l'analyse de la HO et des susceptibilités électrophiles ne permet pas d'assurer quelle position sera attaquée en premier. Par contre, dans le cas des groupements plus encombrants, on s'aperçoit que seule la position amine tertiaire non substituée par un benzyle reste disponible et possède une bonne susceptibilité électrophile. On a donc bon espoir que cette position sera favorisée pour une alkylation.

On peut envisager de former le bicyclic bi-substitué de deux manières différentes, soit par alkylation du bicyclic nu, en se basant sur les résultats de l'équipe de Denat, bien que l'étude théorique nous dise le contraire ou alors en partant de la DETA préalablement di-substituée en espérant accéder à de telles molécules et que la cyclisation ait lieu comme pour la DETA non substituée (Figure 8.2). Une fois le bicyclic obtenu, il faudra alors procéder à la troisième alkylation puis d'ouvrir le macrocycle.

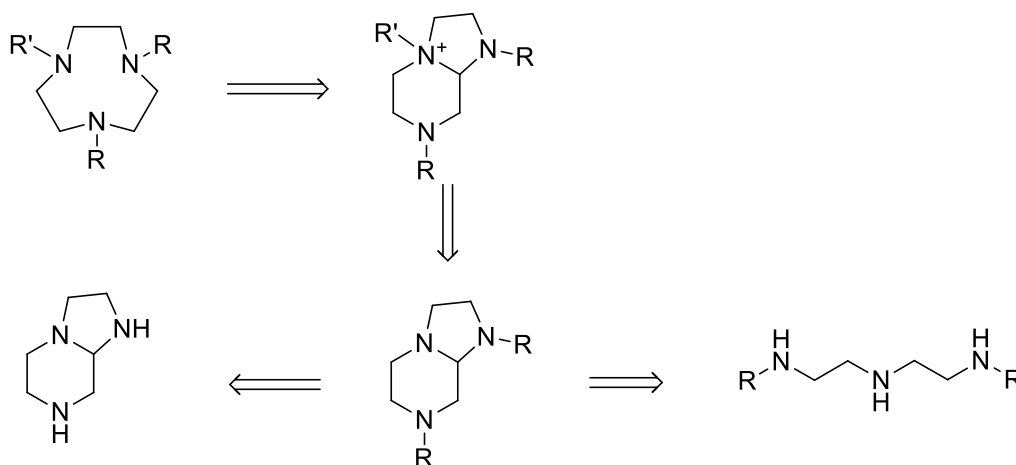


Figure 8.2. Analyse rétrosynthétique

## 2. Par formation du bicyclic nu

Nous avons dans un premier temps essayé de reproduire la synthèse de Denat et de contrôler l'alkylation afin d'accéder au bicyclic bi-substitué. Nous nous sommes malheureusement rendus à l'évidence que le bicyclic nu se dégrade rapidement dans le temps. Il est donc impossible de calculer le nombre d'équivalents d'agent alkylant qu'il faut additionner au milieu et on se retrouve donc toujours avec un mélange de di-substitution et de tri-substitution (Figure 8.3). Il faut également noter qu'aucune espèce n'a été isolée et qu'il n'est donc pas possible de conclure quant à la position des substitutions.

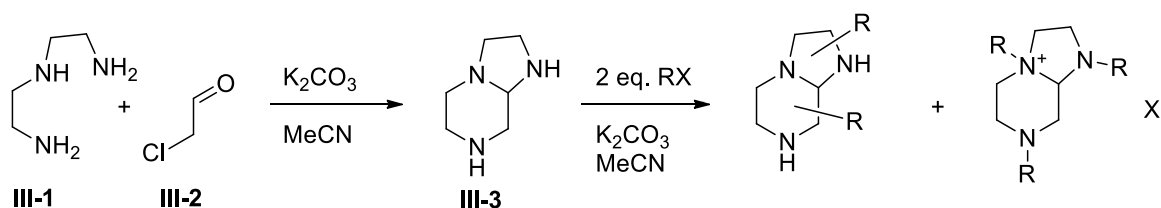


Figure 8.3. Tentatives de bi-substitution de l'intermédiaire bicyclique.

De plus, nous avons été dans l'impossibilité de reproduire les rendements décrits pour la formation du bicycle. Les quelques tentatives menées n'ont abouti qu'à 35-40 % de rendements au maximum contre les 70 % annoncés. Nous avons donc rapidement décidé d'explorer la seconde option.

### 3. Par formation directe du bicycle bi-substitué

Dans un premier temps, il faut parvenir à contrôler l'alkylation de la DETA qui possède deux amines primaires et une amine secondaire. La substitution nucléophile n'étant pas assez spécifique, nous avons choisi d'utiliser l'amination réductrice puisqu'elle permet, a priori, de différencier les amines primaires des amines secondaires. En effet, vu la préorganisation de la DETA, nous soupçonnons la formation d'un aminal intramoléculaire, plus stable vis-à-vis de la réduction et pouvant en théorie s'ouvrir des deux côtés. Fort heureusement, en pratique, l'aminal se réduit sur la position aminal tertiaire et on peut donc accéder, avec d'excellents rendements, à divers dérivés di-alkylés de la DETA (Figure 8.4).<sup>198-200</sup> L'amination réductrice s'effectue en deux temps pour éviter la formation d'imminium. On forme d'abord l'intermédiaire avec un léger excès d'aldéhyde pour être sûr de ne pas avoir de produit mono-substitué. Une fois l'intermédiaire formé, il reste donc en solution un petit peu d'aldéhyde qui est réduit par  $\text{NaBH}_4$  avant, ou du moins en même temps que l'imine-aminal. Ainsi aucune des trois amines secondaires formées ne peut sur-réagir et former du produit tri-substitué.

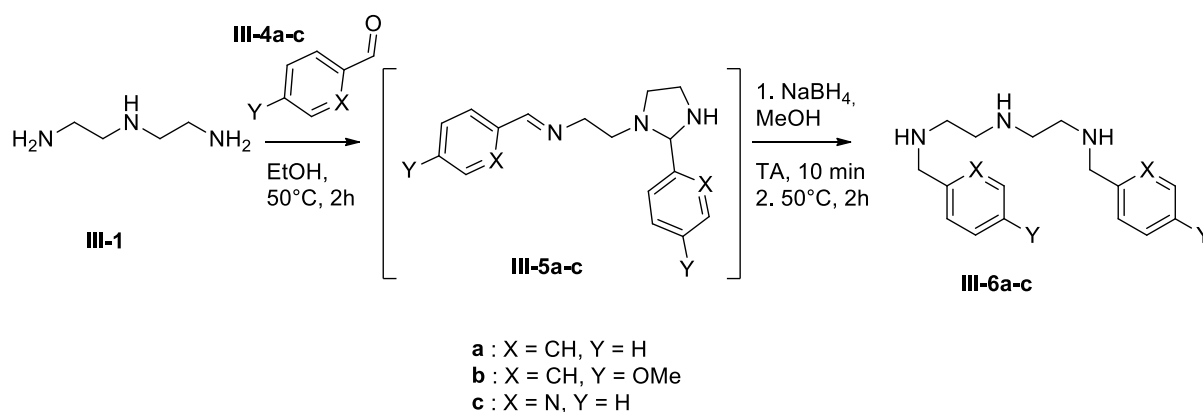


Figure 8.4. Di-alkylation de la DETA.

Pour ce procédé, nous avons choisi d'utiliser des aldéhydes commercialement disponibles, le benzaldéhyde, le *p*-anysaldéhyde et le 2-pyridine-carboxaldéhyde, pour effectuer une preuve de concept et essayer d'accéder à des dérivés d'intérêt pour notre groupe. Cette synthèse s'est révélée être très propre et efficace. Les dérivés benzyliques sont stockés sous forme de sels hydrochloriques tandis que le dérivé dipicolyl doit être conservé sous sa forme neutre puisqu'il ne précipite pas en condition acide. Les DETA bis-alkylés sont ensuite mis à réagir avec le chloroacétaldéhyde pour former le bicycle (Figure 8.5). Contrairement au bicycle nu, les bicycles bi-substitués se sont révélés être stables à température ambiante pendant quelques semaines. Ces produits sont facilement purifiés par précipitation des impuretés dans l'éther diéthylique (une étude des impuretés par étape est disponible en annexe p.166).

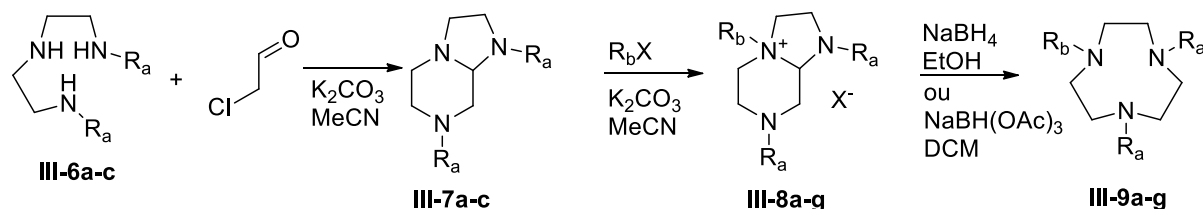
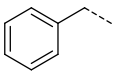

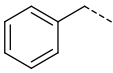
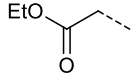
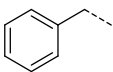
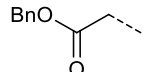
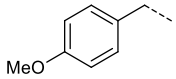

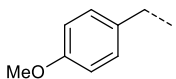
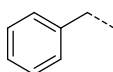
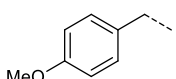
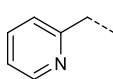
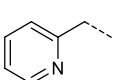
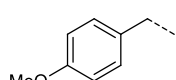


Figure 8.5. Procédure de formation du bicycle et de son ouverture.

Les composés **III-7a-c** se prêtent alors à une quaternisation régiosélective de l'amine engagée dans la liaison aminorale pontante avec une large gamme de composés détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau 8.3). Les sels d'ammonium obtenus peuvent être alors précipités dans l'éther pour obtenir des sels marrons avec des rendements modestes à excellents (29 à 78 %). Il s'est avéré que ces sels sont très fortement hygroscopiques et, par conséquent, il est préférable de les garder à l'abri de l'air ambiant. Le traitement de ceux-ci par action d'hydrures complexes permet d'effectuer l'ouverture de l'aminale de façon exclusive afin d'obtenir les macrocycles cibles proprement. La réaction avec NaBH<sub>4</sub> se déroule en 10 à 15 minutes tandis que l'action d'un réducteur plus doux comme le NaBH(OAc)<sub>3</sub> permet l'ouverture du macrocycle en quelques heures. L'utilisation de NaCNBH<sub>3</sub> n'a pas été testée car l'ion cyanure est connu pour ouvrir le macrocycle en formant une nouvelle liaison C-C, réaction

exploitée par Koek et Denat.<sup>184,197</sup> Un des principaux avantages de cette synthèse est la facilité des purifications : l'alternance des états neutres et chargés permet l'accès aux composés finaux sans une seule purification par chromatographie. Au final, les produits sont obtenus à partir de la DETA avec des rendements totaux entre 21 et 44 % pour 4 étapes et en moins de 5 jours de travail.

Tableau 8.3. Détails des substituants introduits et des réactifs utilisés.

Produit	R <sub>a</sub>	R <sub>b</sub>	X	Réducteur	Rdt total (4 étapes)
<b>III-9a</b>			Br <sup>-</sup>	NaBH <sub>4</sub>	23 %
<b>III-9b</b>			Br <sup>-</sup>	NaBH(OAc) <sub>3</sub>	39 %
<b>III-9c</b>			Br <sup>-</sup>	NaBH(OAc) <sub>3</sub>	43 %
<b>III-9d</b>			I <sup>-</sup>	NaBH <sub>4</sub>	22 %
<b>III-9e</b>			Br <sup>-</sup>	NaBH <sub>4</sub>	21 %
<b>III-9f</b>			Cl <sup>-</sup>	NaBH <sub>4</sub>	37 %
<b>III-9g</b>			Cl <sup>-</sup>	NaBH <sub>4</sub>	44 %

#### 4. Clivage des groupements PMB pour la synthèse de DPTACN

Le choix des groupements détaillés ci-dessus a été motivé par leur faible coût et leur intérêt pour accéder à des molécules de choix pour notre groupe. En effet, une des activités de recherche phare du groupe de Chimie Bio-Organique est un projet de sondes magnétogéniques bio-activables basées sur des complexes de fer avec des ligands à base de DPTACN (di-picolyl-TACN, Figure 8.6)

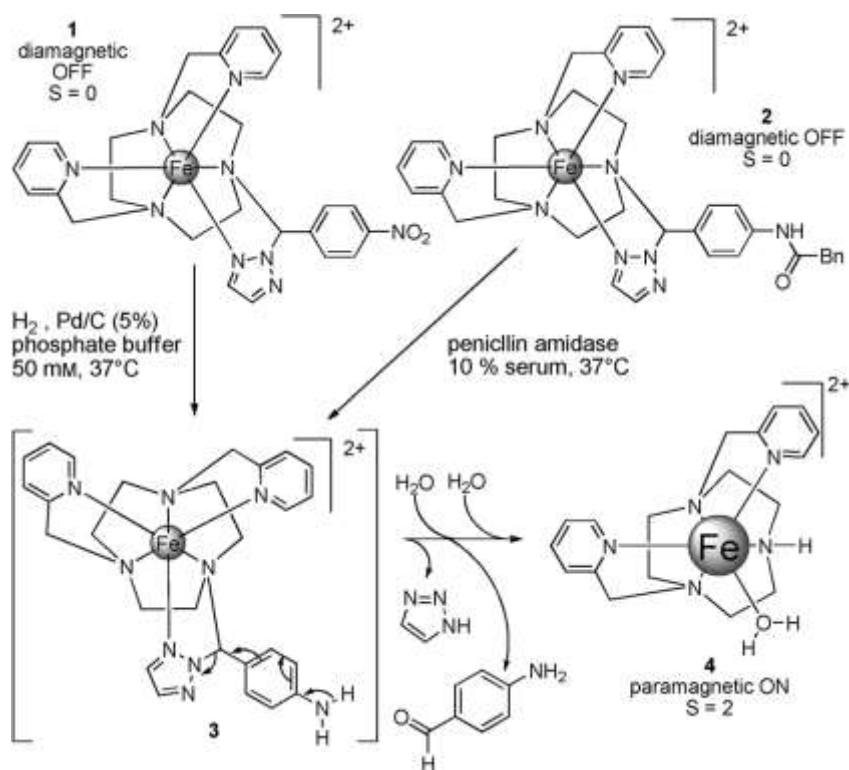


Figure 8.6. Projet de sondes magnétogéniques à base de DPTACN développé par le groupe.

Pour cela, il faut avoir accès à de grandes quantités de DPTACN. Notre première tentative a alors été d'essayer d'ouvrir le bicyclic avant d'effectuer la troisième alkylation (Figure 8.7) mais, malheureusement, le produit obtenu est majoritairement de forme pipéridine **III-10**. Cela confirme que c'est l'ammonium qui dirige la réaction.

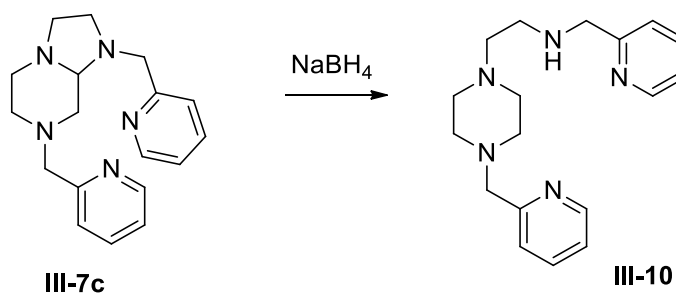


Figure 8.7. Tentative d'ouverture du bicyclic bi-substitué.

Puisqu'il est nécessaire d'alkyler une troisième fois, nous avons choisi d'introduire un groupement *para*-méthoxybenzyle (PMB) car il est connu pour son rôle de groupement protecteur ; il peut être introduit par alkylation et sa forme halogénée est bon marché. Nous avons donc exploré les différentes conditions de clivage de ce groupement. Dans un premier temps, nous avons essayé la déprotection par usage d'oxydants comme la DDQ ou la CAN mais nous n'avons pas constaté la moindre formation du produit désiré, probablement en raison d'une oxydation des amines et de l'ouverture des imines résultantes. L'usage de TFA permet d'observer l'apparition du produit mais

uniquement en présence d'un excès d'acide et à reflux. Ces conditions entraînent, malheureusement, dans un même temps la dégradation partielle de notre composé. A notre grande satisfaction, un réactif moins commun, le 2-chloroéthyl-chloroformate mène à un clivage propre dans des conditions douces (Figure 8.8). Cette réaction se déroule en deux temps (l'intermédiaire est observable par suivi par spectrométrie de masse) : il y a tout d'abord formation d'un carbamate à la place de l'ex-PMB, puis une solvolysse de ce dernier par reflux dans le méthanol.

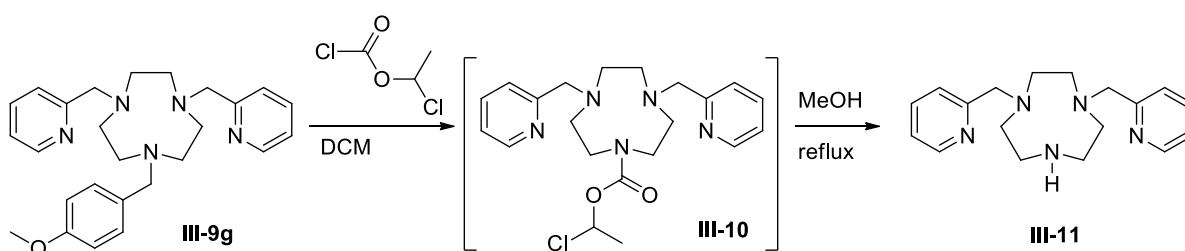


Figure 8.8. Déprotection du groupement PMB par action du 2-chloroéthyl-chloroformate.

Cette technique nous permet maintenant d'obtenir du DPTACN en grande quantité (1 à 10 grammes) en l'espace de 5 à 7 jours de travail. Pour rappel, la synthèse classique permettait d'obtenir des petites quantités de DPTACN en 3 à 4 semaines de travail.

## 5. Conclusion et perspectives

Nous avons donc à notre disposition une nouvelle voie d'accès à des TACNs tri-substitués de façon dissymétrique qui ne comporte que quatre étapes, qui ne nécessite pas de purification par chromatographie et qui présente de bons rendements. De plus, nous avons réussi à cliver les groupements PMB permettant d'accéder au DPTACN, un composé essentiel aux autres activités de recherche du groupe.

Ce procédé ouvre de nombreuses perspectives. Nous pouvons ainsi envisager d'améliorer la synthèse d'un bon nombre de molécules décrites dans la littérature et d'accéder à de nouvelles molécules qui étaient difficile voire impossible d'accès. Quelques-unes de ces perspectives sont décrites ci-après.



### 5.1. Vers des dérivés du NOTA/NODAGA

Parmi les dérivés du TACN, ceux qu'on retrouve le plus souvent dans la littérature et ceux qui sont disponibles commercialement sont les dérivés du NOTA et du NOTAGA (Figure 7.1 et 7.2). Nous avons donc essayé d'appliquer notre méthode à leur synthèse. Malheureusement, l'approche classique, consistant à fonctionnaliser au préalable la DETA, ne fonctionne pas car la molécule cible se cyclise naturellement (Figure 8.9).

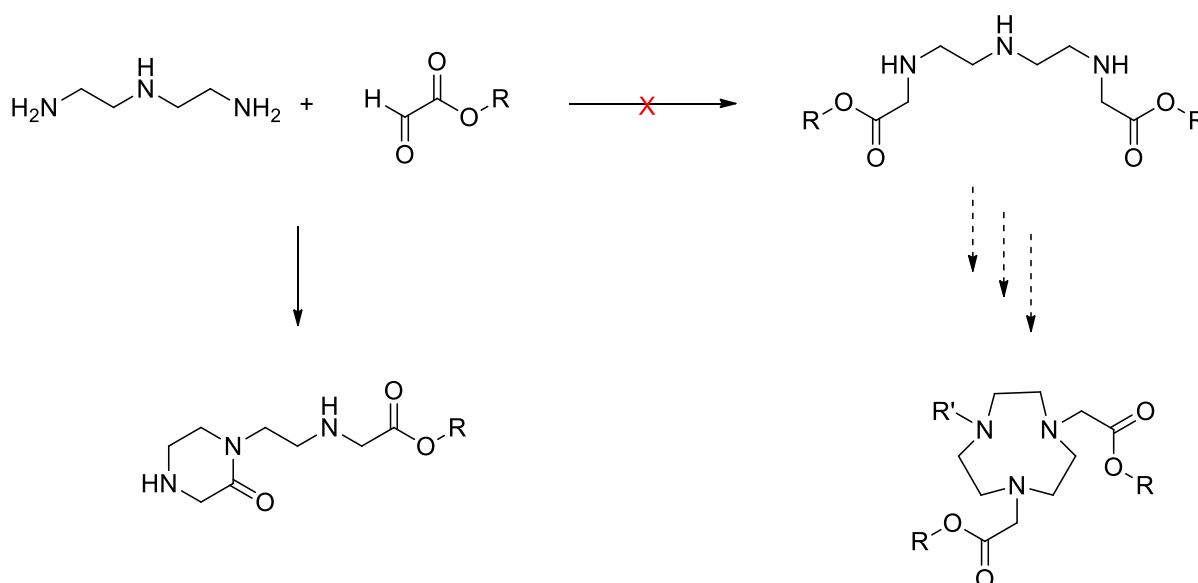


Figure 8.9. Essais de dialkylation de la DETA pour synthétiser des précurseurs de dérivés du NOTA/NODAGA.

On peut envisager deux solutions sans introduire les bras acétates en début de synthèse. On peut soit passer par un intermédiaire dibenzylé avec les groupements benzyles agissant comme groupement protecteur pour accéder à un TACN monosubstitué (cas **a**), Figure 8.10). Soit envisager d'introduire les deux bras acétates sous une autre forme non réactive vis-à-vis de la cyclisation intramoléculaire. Pour cela, on peut utiliser les diols qui pourront être clivé à la fin pour fournir des acides carboxyliques (cas **b**), Figure 8.10). Pour cela, la nature met à notre disposition les sucres qui sont à la fois des aldéhydes et des poly-alcools. La terminaison aldéhyde pourrait donc réagir directement avec la DETA par amination réductrice. On présente une voie avec un sucre protégé pour faciliter la manipulation des produits mais on pourrait également envisager une synthèse en partant d'un sucre quelconque, *eg.* glucose.<sup>201</sup>

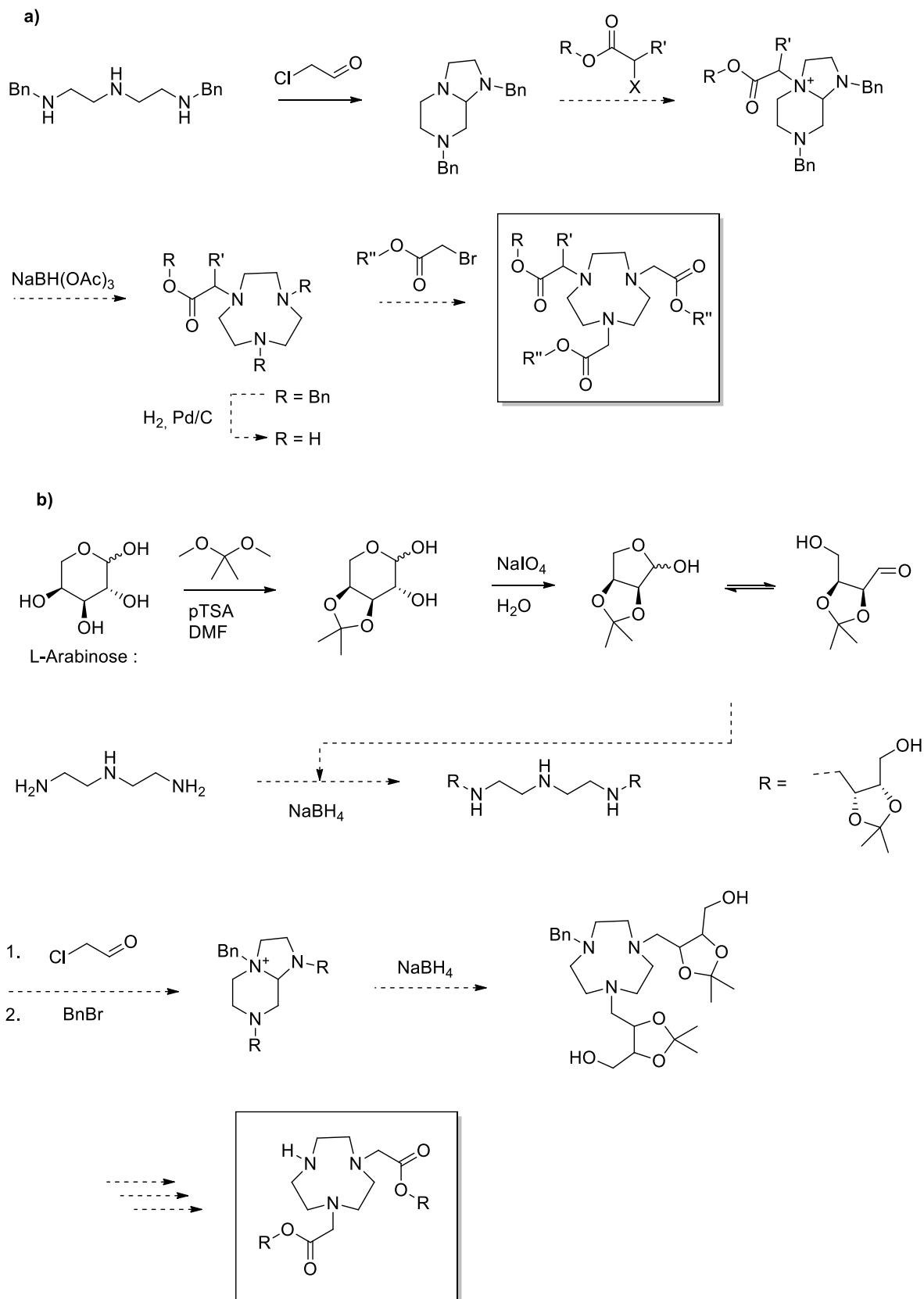


Figure 8.10. Propositions de synthèse menant à des dérivés du NOTA/NODAGA.

## 5.2. En partant d'autres polyéthylènepolyamines

Nous avons à notre disposition, en plus de la DETA, la triéthylènetétraamine (TETA) et la tétraéthylènepentaamine (TEPA) à faible coût. On peut donc envisager des synthèses directes de TACN portant un ou deux bras éthylène-amines.

L'utilisation de la TETA a déjà été explorée dans le cadre du brevet déposé par l'équipe de Denat mais leur stratégie consistait à perbenzyler, ouvrir le cycle puis à débenzyler. L'idée présentée ci-dessous consiste à former le bicyclic, puis à différencier l'amine primaire en la protégeant par un groupement phthalimide, et enfin à fonctionnaliser les deux autres positions afin d'accéder directement à un TACN trisubstitué sans passer par une déprotection complète (Figure 8.11).

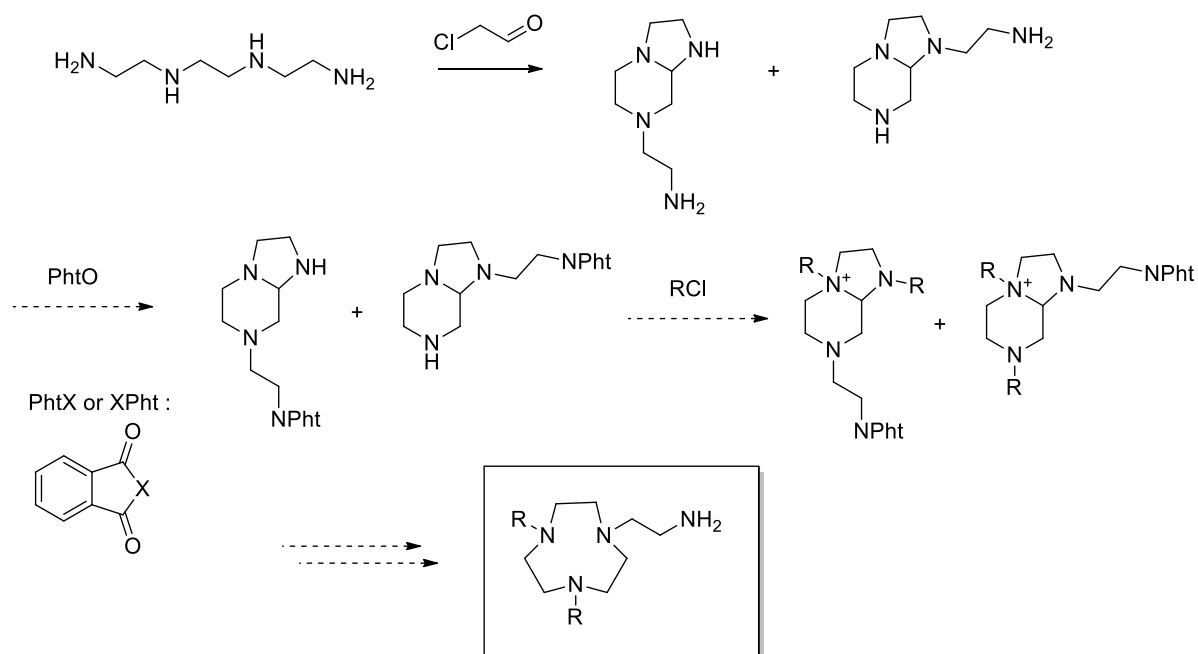


Figure 8.11. Proposition de synthèse pour accéder à un TACN présentant un bras éthylèneamine.

Pour la TEPA, on ne peut pas constituer le bicyclic directement car on souhaite que le chloroacétaldéhyde réagisse avec les amines secondaires et non les amines primaires. Il faut donc envisager une protection de ces dernières, par des groupements phthalimides par exemple (Figure 8.12). Une fois les groupements terminaux protégés, on revient à la situation d'un DETA bisubstitué et la suite de la synthèse est identique au procédé développé.

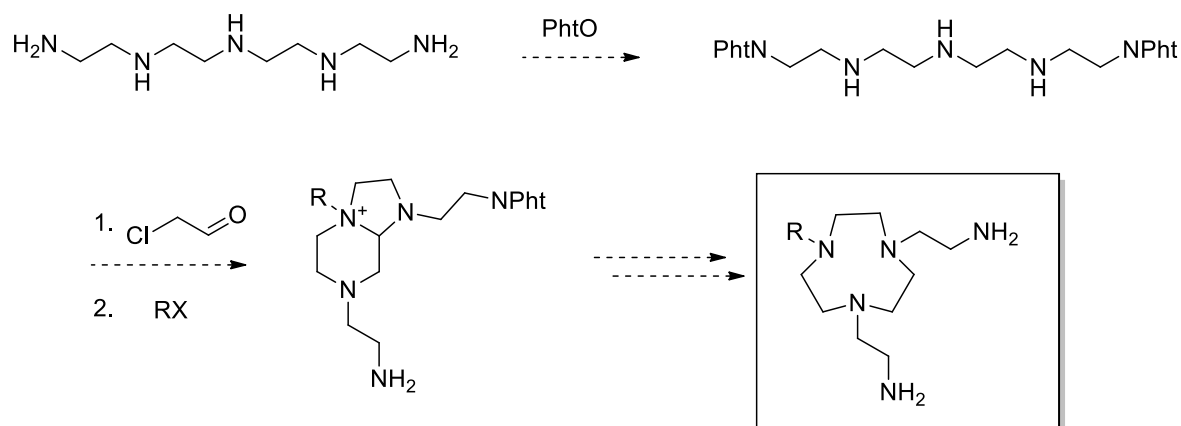


Figure 8.12. Proposition de synthèse pour accéder à un TACN présentant deux bras éthylène-amines.

### 5.3. Autres perspectives

On pourrait appliquer la stratégie développée pour la synthèse d'un cycle légèrement plus grand, le 1,4,7-triazacyclodécane, en partant d'une polyamine avec un carbone supplémentaire (Figure 8.13).

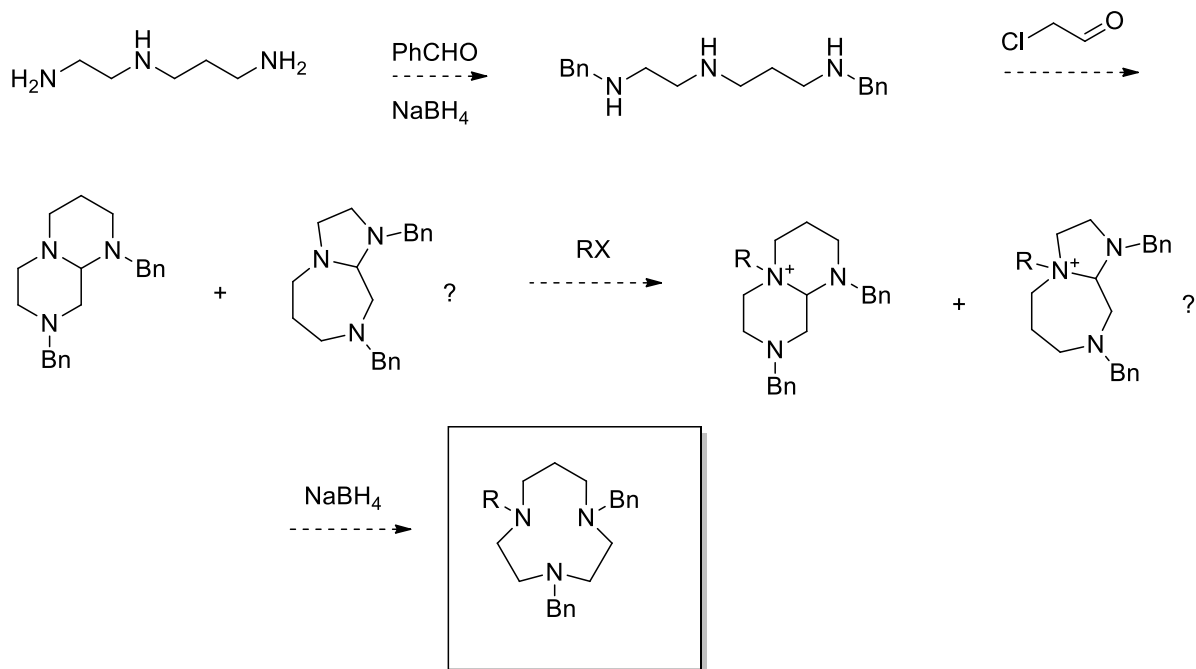


Figure 8.13. Proposition de synthèse de 1,4,7-triazacyclodécane avec un motif de substitution 2Ra/Rb

Et pour finir, on pourrait envisager de ponter deux ou plusieurs TACNs (Figure 8.14).

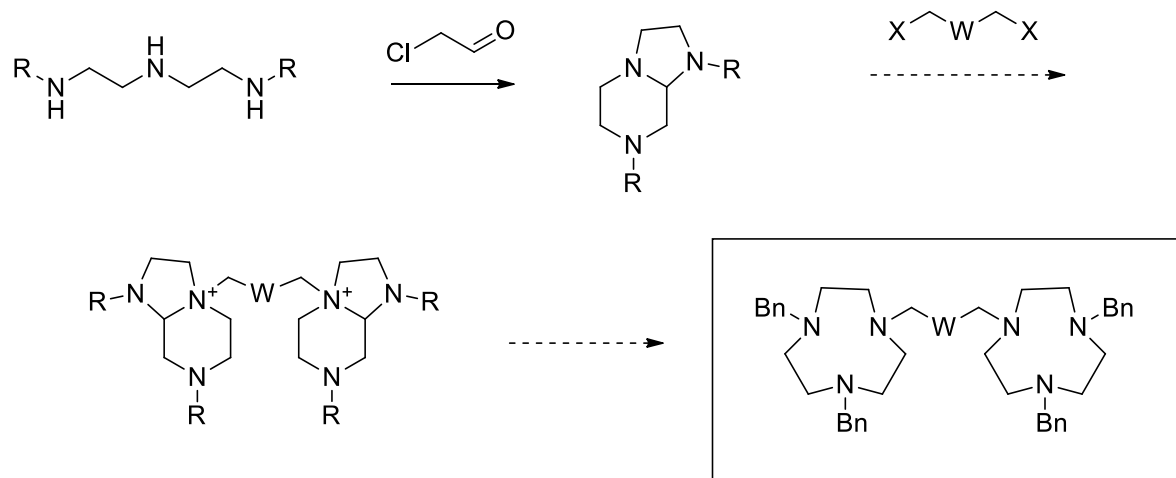


Figure 8.14. Proposition de TACNs pontés.

## Partie expérimentale – Experimental part

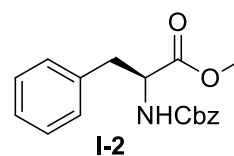
### Chemistry

All reactions were performed in anhydrous solvents and under argon atmosphere unless stated otherwise. Reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) using Merck silica gel 60 aluminium sheets. The plates were visualized by either UV light (254 nm), or by a solution of phosphomolybdic acid. Column chromatography was performed using Merck silica gel Si 60 (40–63  $\mu\text{m}$ ).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were obtained at room temperature with a Bruker 500 MHz spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm (s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet, br = broad) and referenced from tetramethyl silane or from solvent references. NMR coupling constants ( $J$ ) are reported in Hertz.

### Procedures for Part I

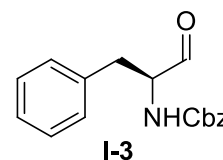
#### N-Cbz-L-phenylalanine Methyl Ester (**I-2**)

To a solution of N-Cbz-L-phenylalanine **I-1** (8.3 g, 27.8 mmol) in 100 mL of anhydrous MeOH was added 1 mL of concentrated sulfuric acid and the resulting mixture was heated at reflux overnight. The solution was then cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in 50 mL Et<sub>2</sub>O and washed successively with 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub>, brine, and finally dried over MgSO<sub>4</sub>. After drying under vacuum **I-2** was obtained as a pale yellow resin (8.0 g, 92 %).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.1–7.3 (m, 10H), 5.30 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H; NH), 5.13 (s, 2H), 4.69 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.14 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50.3 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.0, 155.7, 136.3, 135.7, 129.3, 128.7, 128.6, 128.2, 128.1, 127.2, 67.0, 54.9, 52.4, 38.2.



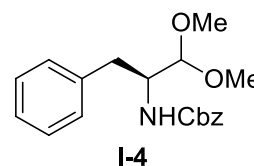
#### (S)-(1-benzyl-2-oxo-ethyl)-carbamic Acid Benzyl Ester (**I-3**)

To a cold (-78 °C) solution of **I-2** (6.8 g, 21.7 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was added dropwise a 1.0 M solution of DIBAL-H in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL, 45 mmol) over 1 h. The reaction mixture, monitored by TLC, was quenched at -78°C with MeOH (30 mL) after 2 hrs and then warmed to room temperature. The mixture was poured into 250 mL of an ice cold 1.2 M HCl aqueous solution, extracted twice with 200 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the combined organic phases were then washed with 300 mL brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Because of



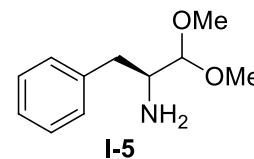
the presence of a chiral center in alpha position of the aldehyde, the next step was performed immediately with the crude product.

**(S)-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-carbamic Acid Benzyl Ester (I-4)**



The crude **I-3** (23.2 mmol) was dissolved in 160 mL of anhydrous MeOH, and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (3.0 g, 15.8 mmol) was added. The reaction was stirred overnight, and then most of the solvent was removed under vacuum. 100 mL of a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> was added, and the mixture was extracted twice with 100 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **I-4** as a white solide (5.67 g, 84 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35-7.19 (m, 10H), 5.07 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.4 Hz, 1H), 5.01 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.4 Hz, 1H), 4.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.17 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.11-4.09 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 2.93 (dd, *J*<sub>AB</sub> = 13.8, *J* = 6.1 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J*<sub>AB</sub> = 13.8, *J* = 8.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155.9, 137.7, 136.5, 129.2, 128.3, 127.8, 127.7, 126.2, 104.6, 66.4, 55.6, 55.4, 53.4, 35.8.

**(S)-1-benzyl-2,2-dimethoxyethan-1-amine (I-5)**



To a suspension of Pd on C (0.9 g, 5% wet Degussa type) in MeOH (50 mL) under hydrogen atmosphere, 2.18 g of **I-4** (6.6 mmol) were added and the reaction was stirred at room temperature. After 3 h, the reaction mixture was filtered on a Celite pad and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield **I-5** (1.2 g, quant) as a yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32-7.21 (m, 5H), 4.11 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 3.15-3.11 (m, 1H), 2.97 (dd, *J*<sub>AB</sub> = 13.5, *J* = 4.0 Hz, 1H), 2.51 (dd, *J*<sub>AB</sub> = 13.5, *J* = 9.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138.7, 129.2, 128.3, 126.1, 107.5, 55.0, 54.8, 53.9, 38.4.

**General coupling procedure**

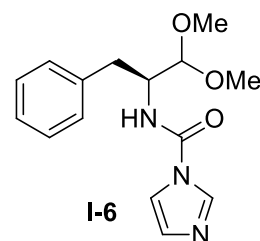
A solution of amine in anhydrous THF (1 mL per mmol) was added dropwise to a stirred suspension of CDI (1.1 equiv.) in anhydrous THF (1 mL per mmol) at room temperature. After 30 min the solvent was evaporated, and the residue redissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL per mmol) and washed twice with water (2 mL per mmol). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent evaporated under vacuum to give pure imidazole carboxamide.

The imidazole carboxamide compound was dissolved in anhydrous acetonitrile (1.5 mL per mmol) and iodomethane (4 equiv.) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature, then the solvent was evaporated, and the yellow orange oil was dried under vacuum. The residue was redissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL per mmol), and the hydrazine (1 equiv.) and triethylamine (1 equiv.) were added. After stirring for 24h at room temperature, the reaction was quenched by adding saturated

aqueous  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL per mmol), and the mixture was extracted  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (twice with 5 mL per mmol). The combined organic extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$ , and the solvent was removed under vacuum. After purification by flash chromatography (1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), the urea compound was obtained.

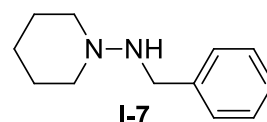
**(S)-Imidazole-1-carboxylic Acid (1-Benzyl-2,2-dimethoxyethyl)-amide (I-6)**

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.04 (s, 1H), 7.33-7.22 (m, 6H), 7.07 (s, 1H), 5.90 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 4.42-4.37 (m, 1H), 4.26 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.02-2.94 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.6, 137.0, 135.9, 130.5, 129.2, 128.7, 126.8, 115.8, 104.1, 56.0, 55.7, 53.5, 36.0.



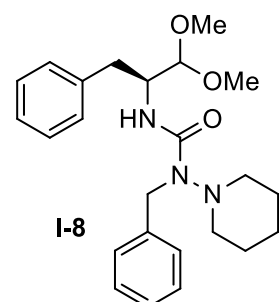
**Benzyl-piperidin-1-yl-amine (I-7)**

Benzaldehyde (2.44 g, 23.02 mmol) and 1-Aminopiperidine (2.00 g, 20.00 mmol) were stirred at room temperature in anhydrous MeOH (150 mL) overnight. Acetic acid (30 mL, 525 mmol) and  $\text{NaCNBH}_3$  (6.30 g, 100 mmol) were added, and stirring was continued for 2 h. Most of the solvent was removed under vacuum. Then a pH value around 8 was adjusted by adding  $\text{NaHCO}_3$  (saturated aqueous solution, 40 mL) and NaOH (aqueous solution, 10 mL), and the mixture was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 40$  mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and the solvent was evaporated under vacuum. After purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane), **I-7** was obtained as a colorless oil (3.44 g, 91%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36-7.23 (m, 5H), 3.97 (s, 2H), 2.67 (br s, 4H), 1.66-1.62 (m, 4H), 1.57-1.52 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138.9, 128.3, 128.0, 126.7, 57.3, 52.6, 25.8, 23.7.



**(S)-1-Benzyl-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-8)**

From **I-6** + **I-7**. Colorless oil, yield : 85 %.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.29-7.13 (m, 10H), 6.61 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 4.60 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H), 4.45 (d,  $J$  = 16.3 Hz, 1H), 4.31-4.27 (m, 2H), 3.473 (s, 3H), 3.468 (s, 3H), 3.06 (dd,  $J$  = 13.9, 4.5 Hz, 1H), 2.78 (dd,  $J$  = 13.9, 8.9 Hz, 1H), 2.71-2.69 (m, 1H), 2.52-2.48 (m, 1H), 2.42-2.40 (m, 1H), 2.36-2.32 (m, 1H), 1.65-1.42 (m, 5H), 1.03-0.95 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.8, 140.5, 138.6, 129.4, 128.2, 128.1, 127.2, 126.4, 126.0, 105.9, 56.3, 55.0, 53.4, 53.1, 52.1, 42.0, 35.3, 26.4, 23.2.



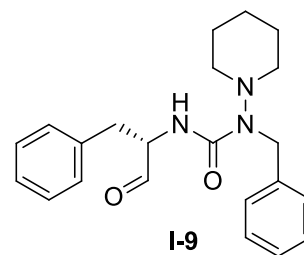


**General procedure for the deprotection of all acetal precursors to hydrazino-aldehydes**

To a solution of the acetal precursor in anhydrous acetonitrile (20 mL per mmol) were added NaI (3 equiv.) and TMSCl (2 equiv.). The reaction was stirred at room temperature for 1.5 h and was then quenched by adding NaHCO<sub>3</sub> (saturated aqueous solution, 20 mL per mmol). The mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 times 60 mL per mmol), and the combined organic extracts were washed with Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (saturated solution, 100 mL per mmol) and then with water (60 mL per mmol). The organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under vacuum to give the crude aldehyde.

**(S)-1-Benzyl-3-(1-benzyl-2-oxo-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-9)**

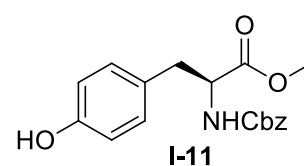
From acetal **I-8** (220 mg, 0.53 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:2 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-9** as a colorless oil (164 mg, 85 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.66 (s, 1H; CHO), 7.25-7.12 (m, 10H; Ar), 6.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H; NH), 4.51 (s, 2H;



NCH<sub>2</sub>Ph), 4.50-4.46 (m, 1H; NHCH), 3.12 (dd, *J* = 6.0 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>Ph), 3.05 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>Ph), 2.64-2.62 (m, 1H; NNCH<sub>2</sub>piperidine), 2.48-2.36 (m, 3H; NNCH<sub>2</sub>pip), 1.54-1.50 (m, 3H; CH<sub>2</sub>pip), 1.36-1.22 (m, 2H; CH<sub>2</sub>pip), 0.95-0.87 (m, 1H; CH<sub>2</sub>pip). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.7 (CHO), 158.0 (NCON), 140.0 (Ar), 136.4 (Ar), 129.3 (Ar), 128.6 (Ar), 128.3 (Ar), 127.4 (Ar), 126.9 (Ar), 126.7 (Ar), 60.2 (NHCH), 53.5 (NNCH<sub>2</sub>pip), 53.4 (NNCH<sub>2</sub>pip), 42.3 (NCH<sub>2</sub>Ph), 35.3 (CH<sub>2</sub>Ph), 26.3 (CH<sub>2</sub>pip), 26.2 (CH<sub>2</sub>pip), 23.1 (CH<sub>2</sub>pip). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>), (1:1 mixture of two diastereomers) δ 7.33-7.10 (m, 18H; Ar), 6.94-6.88 (m, 2H; Ar), 4.61-4.57 (m, 4H; NCH<sub>2</sub>Ph, <sup>δ+</sup>N→CH=O<sup>δ-</sup>), 4.49-4.45 (m, 2H; NCH<sub>2</sub>Ph), 4.14-4.05 (m, 2H; NHCH), 3.12-3.05 (m, 2H; CH<sub>2</sub>Ph), 2.81-2.72 (m, 4H; CH<sub>2</sub>Ph, NNCH<sub>2</sub>pip), 2.64-2.58 (m, 2H; NNCH<sub>2</sub>pip), 2.41-2.37 (m, 4H; NNCH<sub>2</sub>pip), 1.67-1.60 (m, 10H; CH<sub>2</sub>pip), 1.11-1.04 (m, 2H; CH<sub>2</sub>pip). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) δ 160.9 (NCON), 160.8 (NCON), 142.4 (Ar), 140.9 (Ar), 131.39 (Ar), 131.37 (Ar), 130.2 (Ar), 130.0 (Ar), 129.03 (Ar), 129.02 (Ar), 128.4 (Ar), 128.1 (Ar), 100.5 (<sup>δ+</sup>N→CH=O<sup>δ-</sup>), 100.1 (<sup>δ+</sup>N→CH=O<sup>δ-</sup>), 57.5 (NHCH), 57.4 (NHCH), 55.41 (NNCH<sub>2</sub>pip), 55.38 (NNCH<sub>2</sub>pip), 54.92 (NNCH<sub>2</sub>pip), 54.86 (NNCH<sub>2</sub>pip), 43.9 (NCH<sub>2</sub>Ph), 37.44 (CH<sub>2</sub>Ph), 37.36 (CH<sub>2</sub>Ph), 28.36 (CH<sub>2</sub>pip), 28.34 (CH<sub>2</sub>pip), 28.30 (CH<sub>2</sub>pip), 28.24 (CH<sub>2</sub>pip), 25.1 (CH<sub>2</sub>pip). MS (ESI) *m/z* 366.2 ([M + H]<sup>+</sup>, 100). HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 366.2182, found 366.2187. Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 72.30; H, 7.45; N, 11.50. Found: C, 72.19; H, 7.48; N 11.46.

**N-Cbz-L-tyrosine Methyl Ester (I-11)**

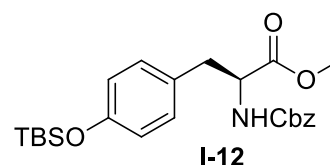
To a solution of N-Cbz-L-tyrosine **I-10** (10.0 g, 31.7 mmol) in 100 mL of anhydrous MeOH was added 1 mL of concentrated sulfuric acid and the resulting mixture was heated at reflux overnight. The solution was then



cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in 30 mL Et<sub>2</sub>O was added and washed successively with 5% aqueous NaHCO<sub>3</sub>, brine, and finally dried over MgSO<sub>4</sub>. After drying under vacuum **I-11** was obtained as a pale yellow resin (9.0 g, 86 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35 (m, 5H), 6.96 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.69 (bs, 1H; OH), 5.29 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H; NH), 5.14 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.2, 1H), 5.10 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.2, 1H), 4.65 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.08 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.3, 155.8, 155.0, 136.1, 130.4, 128.6, 128.3, 128.1, 127.4, 115.6, 67.1, 55.0, 52.4, 37.5.

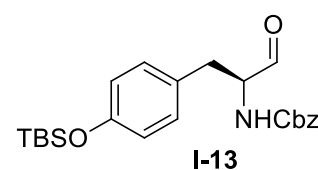
#### O-TBS-N-Cbz-L-tyrosine methyl ester (**I-12**)

To a solution of N-Cbz-L-tyrosine methyl ester **I-11** (9.0 g, 27.3 mmol) in 85 mL of anhydrous DMF under argon atmosphere was added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (6.5 g, 43.1 mmol, 1.6 equiv.) and imidazole (3.5 g, 51.4 mmol, 1.9 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was diluted in 70 mL of EtOAc which was then washed twice with 100 mL of aqueous 10 % LiCl. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give **I-12** (10.3 g, 85%) as a yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 (m, 5H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H; NH), 5.13 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.4, 1H), 5.10 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.4, 1H), 4.63 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.08 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.4 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.4 Hz, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.21 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.1, 155.7, 154.8, 136.3, 130.3, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 120.2, 66.9, 55.0, 52.3, 37.5, 25.7, 18.2, -4.4.



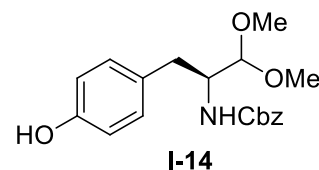
#### (S)-(1-(4-*tert*-Butyldimethylsilyloxy)benzyl-2-oxo-ethyl)-carbamic Acid Benzyl Ester (**I-13**)

To a cold (-78 °C) solution of **I-12** (10.3 g, 23.2 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was added dropwise a 1.0 M solution of DIBAL-H in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL, 50 mmol) over 40 min. The reaction mixture, monitored by TLC, was quenched at -78°C with MeOH (30 mL) after 2 hrs and then warmed to room temperature. The mixture was poured into 300 mL of an ice cold 1.2 M HCl aqueous solution, extracted twice with 300 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the combined organic phases were then washed with 300 mL brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. Because of the presence of a chiral center in alpha of the aldehyde, the next step was performed immediately with the crude product.

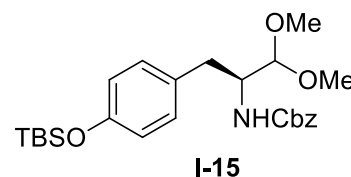


**(S)-(1-(4-Hydroxy)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-carbamic Acid****Benzyl Ester (I-14)**

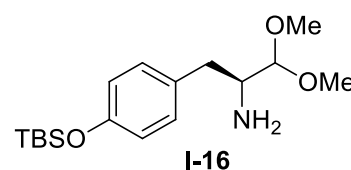
The crude **I-13** (23.2 mmol) was dissolved in 180 mL of anhydrous MeOH, and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (3.0 g, 15.8 mmol) was added. The reaction was stirred overnight, and then most of the solvent was removed under vacuum. 100 mL of a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> was added, and the mixture was extracted twice with 100 mL of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (gradient 1:9 to 3:7, EtOAc: Cyclohexane) gave **I-14** as a white solid (5.67 g, 61 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30 (m, 5H), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.07 (m, 2H), 4.20 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 2.87 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.1 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 5.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.1 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.5, 154.8, 136.4, 130.3, 128.5, 128.1, 127.9, 115.4, 104.9, 68.9, 55.8, 55.7, 52.4, 35.3. HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NNaO<sub>5</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 368.1468, found 368.1463.

**(S)-(1-(tert-Butyldimethylsilyloxy)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-carbamic Acid Benzyl Ester (I-15)**

To a solution of **I-14** (1.67 g, 4.8 mmol) in 12 mL of anhydrous DMF was added under argon atmosphere *tert*-butyldimethylsilyl chloride (1.0 g, 7.2 mmol, 1.5 equiv.) and imidazole (0.5 g, 8.2 mmol, 1.7 equiv.) at room temperature for 12 h. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue was diluted in 20 mL of EtOAc which was then washed twice with 20 mL of aqueous 10 % LiCl. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give **I-15** (1.89 g, 86%) as a yellowish oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32 (m, 5H), 7.07 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 5.09 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.3, 1H), 5.04 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.3, 1H), 4.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H; NH), 4.17 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 2.87 (dd, *J* = 6.4 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.2 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 6.4 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.2 Hz, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.21 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.1, 154.2, 136.6, 130.2, 128.5, 128.0, 127.9, 120.0, 104.7, 66.6, 55.7, 55.6, 53.5, 35.3, 25.7, 18.2, -4.4. HRMS (ESI) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>NNaO<sub>3</sub>Si [M + Na]<sup>+</sup> 482.2333, found 482.2336.

**(S)-1-(tert-Butyldimethylsilyloxy)benzyl-2,2-dimethoxyethan-1-amine (I-16)**

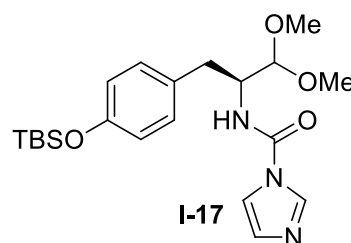
To a suspension of Pd on C (0.7 g, 5% wet Degussa type) in MeOH (45 mL) under hydrogen atmosphere, 1.88 g of **I-15** (4.1 mmol) were added and the reaction was stirred at room temperature. After 3 h, the reaction mixture was filtered on a Celite pad and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield **I-16** (1.36 g, quant) as a yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.10 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.45



(s, 3H), 3.10 (m, 1H), 2.91 (dd,  $J = 4.1$  Hz,  $J_{AB} = 13.6$  Hz, 1H), 2.47 (dd,  $J = 9.3$  Hz,  $J_{AB} = 13.6$  Hz, 1H), 1.00 (s, 9H), 0.21 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154.1, 131.4, 130.2, 120.1, 107.8, 55.1, 55.0, 54.2, 37.8, 25.7, 18.2, -4.4. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{NO}_3\text{Si}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  326.2146, found 326.2141.

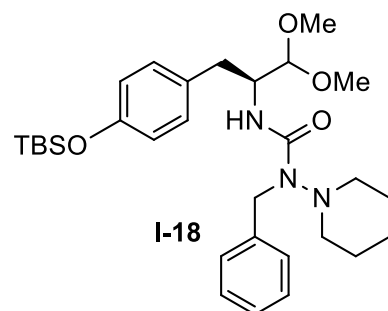
**(S)-Imidazole-1-carboxylic Acid (1-(*p*-tert-Butyldimethylsilyloxy)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-amide (I-17)**

Yellow oil, yield : 86%.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.06 (s, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.09 (m, 3H), 6.79 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 4.35 (m, 1H), 4.26 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.40 (s, 3H), 2.93 (dd,  $J = 7.0$  Hz,  $J_{AB} = 14.4$  Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J = 7.6$  Hz,  $J_{AB} = 14.4$  Hz, 1H), 0.98 (s, 9H), 0.19 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  154.5, 148.6, 135.9, 130.5, 130.1, 129.6, 120.3, 115.8, 104.1, 56.0, 55.7, 53.7, 35.3, 25.7, 18.2, -4.4.



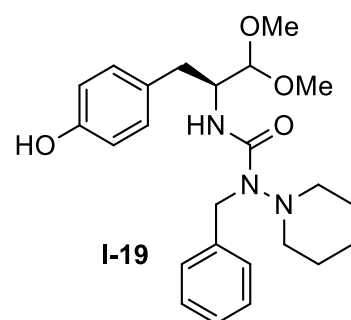
**(S)-1-Benzyl-3-(1-(*p*-tert-Butyldimethylsilyloxy)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-18)**

From **I-17** + **I-7**. Colorless oil, yield : 82%.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.27 (m, 2H), 7.19 (m, 3H), 7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.64 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H; NH), 4.62 (d,  $J_{AB} = 16.4$  Hz, 1H), 4.50 (d,  $J_{AB} = 16.4$  Hz, 1H), 4.31 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.00 (dd,  $J = 5.0$  Hz,  $J_{AB} = 13.8$  Hz, 1H), 2.74 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 1.63 (m, 3H), 1.51 (m, 2H), 1.01 (m, 10H), 0.19 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157.9, 154.0, 140.6, 131.2, 130.4, 128.3, 127.3, 126.5, 119.8, 105.8, 56.2, 54.9, 53.5, 53.2, 52.2, 42.1, 34.7, 26.5, 25.7, 18.2, -4.4. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{Si}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  564.3228, found 564.3221.



**(S)-1-Benzyl-3-(1-(4-hydroxy)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-19)**

Compound **I-18** (415 mg, 0.77 mmol) was dissolved in 25 mL THF and 1.5 mL of a 1M solution of tetra-*n*-butylammonium fluoride in THF was added dropwise. The reaction was stirred for 10 min and the solvent was evaporated. The residue was redissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) and washed with water (20 mL). The aqueous phase was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), and the combined organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under vacuum. After purification by flash chromatography (gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), **I-19** (332 mg, quant) was obtained as a colorless gel-oil.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.25 (m, 2H), 7.17 (m, 3H), 7.02 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.77 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H; NH), 6.69 (d,  $J = 8.5$  Hz,

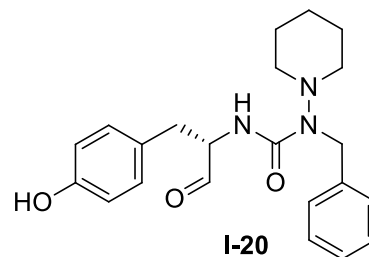


2H), 4.61 (d,  $J_{AB} = 16.0$  Hz, 1H), 4.54 (d,  $J_{AB} = 16.0$  Hz, 1H), 4.29 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.46 (s, 3H), 2.95 (dd,  $J = 5.0$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H), 2.70 (m, 2H), 2.51 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 1.63 (m, 3H), 1.53 (m, 2H), 1.01 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.3, 155.3, 140.2, 130.2, 129.3, 128.3, 127.2, 126.6, 115.4, 105.9, 56.2, 55.3, 53.4, 53.3, 52.8, 42.3, 35.0, 26.4. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_4$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  450.2363, found 450.2355.

### (S)-1-Benzyl-3-(1-(4-hydroxy)benzyl-2-oxo-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (**I-20**)

From acetal **I-19** (32 mg, 0.07 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-20** as a colorless oil (17 mg, 59 %).

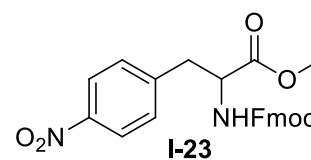
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.71 (s, 1H; CHO), 7.28 (m, 5H;  $\text{Ar}_{\text{Phenyl}}$ ), 7.04 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H; NH), 6.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H;  $\text{Ar}_{\text{Phenol}}$ ), 6.71 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H;  $\text{Ar}_{\text{Phenol}}$ ), 4.61 (m, 3H;  $\text{NCH}_2\text{Ph} + \text{NHCH}$ ), 3.10 (dd,  $J = 6.2$  Hz,  $J_{AB}$



= 14.0 Hz, 1H;  $\text{CH}_A\text{H}_B\text{Phenol}$ ), 3.02 (dd,  $J = 7.0$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H;  $\text{CH}_A\text{H}_B\text{Phenol}$ ), 2.75 (m, 1H;  $\text{NNCH}_{2\text{piperidine}}$ ), 2.60 (m, 1H;  $\text{NNCH}_{2\text{pip}}$ ), 2.50 (m, 2H;  $\text{NNCH}_{2\text{pip}}$ ), 1.61 (m, 3H;  $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ), 1.45 (m, 2H;  $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ), 1.00 (m, 1H;  $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.9 (CHO), 158.3 (NCON), 155.7 ( $\text{Ar}_{\text{Phenol}}\text{COH}$ ), 139.8 ( $\text{Ar}_{\text{Phenyl}}\text{CCH}_2\text{N}$ ), 130.3 ( $\text{Ar}_{\text{Phenol}}$ ), 128.4 (2 $\text{Ar}_{\text{Phenyl}}$ ), 127.4 (2 $\text{Ar}_{\text{Phenyl}}$ ), 126.8 ( $\text{Ar}_{\text{Phenyl}}$ ), 115.7 ( $\text{Ar}_{\text{Phenol}}$ ), 60.5 (NHCH), 53.6 ( $\text{NNCH}_{2\text{pip}}$ ), 53.4 ( $\text{NNCH}_{2\text{pip}}$ ), 42.5 ( $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 34.7 ( $\text{CH}_2\text{Phenol}$ ), 26.4 ( $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ), 26.3 ( $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ), 23.1 ( $\text{CH}_{2\text{pip}}$ ). HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_3$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  404.1945, found 404.1941.

### N-Fmoc-L-p-Nitrophenylalanine Methyl Ester (**I-23**)

Thionyl chloride (1.03 ml, 14.2 mmol) was added dropwise to a suspension of L-p-Nitrophenylalanine **I-21** (0.995 g, 4.73 mmol) in 10 ml of MeOH at 0°C. After the addition, the solution formed was allowed to

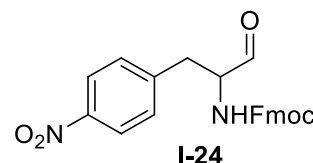


warm to room temperature. The reaction mixture was heated under reflux overnight and then concentrated. The crude material was recrystallized from methanol/ethyl acetate to give 1.012 g (95%) of L-p-Nitrophenylalanine Methyl Ester Hydrochloride **I-22**.

The obtained ester **I-22** (1.178 g, 5.23 mmol) was dissolved in a solution of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.59 g, 11.5 mmol) in dioxane/water (1:1, 20 mL). The mixture was cooled to 0 °C and Fmoc-chloride (1.42 g, 5.5 mmol) was added in one batch. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, and then overnight at room temperature. The reaction mixture was subsequently concentrated, the residue was diluted in water (10 mL) and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL). The combined organic extracts were washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and the solvent was evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (gradient 1:5 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **I-23** as a white solid (1.81 g, 78 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.18 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.83 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.47 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.37 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 5.30 (d,  $J = 7.4$  Hz,

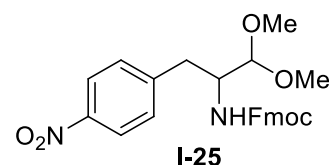
2H), 4.74 (m, 1H), 4.57 (dd,  $J = 6.2$  Hz,  $J_{AB} = 10.5$  Hz, 1H), 4.47 (dd,  $J = 6.2$  Hz,  $J_{AB} = 10.5$  Hz, 1H), 4.25 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.31 (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $J_{AB} = 13.6$  Hz, 1H), 3.20 (dd,  $J = 5.5$  Hz,  $J_{AB} = 13.6$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.2, 155.4, 147.2, 143.7, 143.6, 141.5, 130.3, 127.9, 127.1, 124.9, 123.8, 120.1, 66.8, 54.5, 52.7, 47.2, 38.1.

**(S)-(1-(*p*-Nitro)benzyl-2-oxo-ethyl)-carbamic Acid 9H-fluoren-9-ylmethyl Ester (I-24)**



To a cold ( $-78^\circ\text{C}$ ) solution of **I-23** (1.81 g, 4.05 mmol) in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) was added dropwise a 1.0 M solution of DIBAL-H in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9.5 mL, 9.5 mmol) over 40 min. The reaction mixture, monitored by TLC, was quenched at  $-78^\circ\text{C}$  with MeOH (8 mL) after 4 hrs and then warmed to room temperature. The mixture was poured into 30 mL of an ice cold 2 M HCl aqueous solution, extracted twice with 30 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and the combined organic phases were then washed with 50 mL brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. Because of the presence of a chiral center in alpha of the aldehyde, the next step was performed immediately with the crude product.

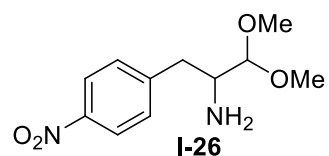
**(S)-(1-(*p*-Nitro)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-carbamic Acid 9H-fluoren-9-ylmethyl Ester (I-25)**



The crude **I-24** (4.047 mmol) was dissolved in 30 mL of anhydrous MeOH, and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0.6 g, 3.2 mmol) was added. The reaction was stirred overnight, and then most of the solvent was removed under vacuum. 25 mL of a solution of aqueous saturated  $\text{NaHCO}_3$  was added, and the mixture was extracted twice with 25 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and the solvent was evaporated under vacuum. Purification by flash chromatography (1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **I-25** as a pale yellow solid (1.162 g, 53 %, two steps).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.17 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.81 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.57 (m, 2H), 7.45 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 4.94 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.12 (dd,  $J = 4.3$  Hz,  $J_{AB} = 13.2$  Hz, 1H), 2.89 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J_{AB} = 13.2$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.0, 146.7, 146.1, 143.8, 141.4, 130.2, 127.8, 127.1, 124.9, 123.6, 120.1, 105.1, 66.6, 56.3, 55.9, 53.4, 47.3, 35.5. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_6$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  485.1683, found 485.1680.

**(S)-1-(*p*-Nitro)benzyl-2,2-dimethoxyethan-1-amine (I-26)**

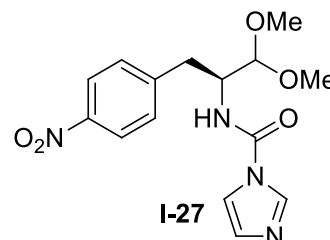
The N-Fmoc protected  $\alpha$ -aminoacetal **I-25** (0.156 g, 0.34 mmol) was treated with 20% piperidine in DMF (1.0 mL, 6 equiv.) and stirred for 20 min at room temperature. After concentration in vacuo, the residue was



purified by column chromatography (7:3, EtOAc: hexane; 1:9, MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to yield **I-26** as pale yellow oil (64 mg, 79 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.10 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.05 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.13-2.95 (m, 2H), 2.59 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.4 Hz, 1H), 1.82 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>). HRMS (ESI) calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup> 241.1183, found 241.1187.

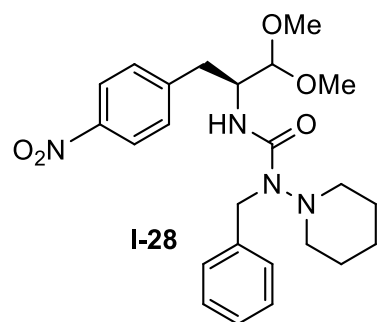
**(S)-Imidazole-1-carboxylic Acid (1-(*p*-Nitro)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-amide (I-27)**

This product was not isolated. Next step was conducted on the crude product.



**(S)-1-Benzyl-3-(1-(4-nitro)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-28)**

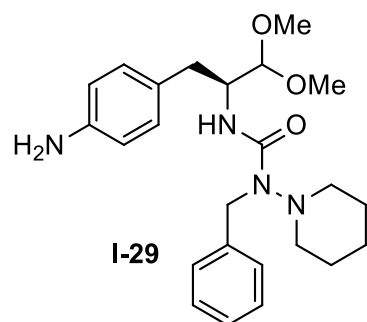
From **I-27** + **I-7**. Colorless oil, yield : 46%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.28-7.16 (m, 5H), 6.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.64 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.6 Hz, 1H), 4.46 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.6 Hz, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.21 (dd, *J* = 4.6 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 12.9 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 12.9 Hz, 1H), 2.74 (m, 2H), 2.59 (m, 2H), 2.47 (m, 1H), 1.67 (m, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.05 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.7, 147.3, 146.6, 140.3, 130.4, 128.3, 127.3, 126.8, 123.4, 106.2, 56.8, 55.6, 53.8, 53.2, 52.1, 42.3, 35.5, 26.5. HRMS (ESI) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 479.2265, found 479.2275.



**(S)-1-Benzyl-3-(1-(4-amino)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-29)**

To a suspension of Pd on C (0.1 g, 10% wet Degussa type) in MeOH (10 mL) under hydrogen atmosphere, 231 mg of **I-28** (0.52 mmol) were added and the reaction was stirred at room temperature. After 2 h, the reaction mixture was filtered on a Celite pad and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield **I-29** (216 mg, quant)

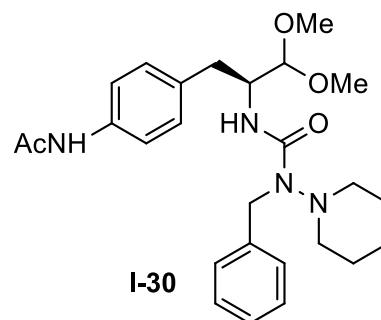
as a yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.32-7.21 (m, 5H), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.64 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.0 Hz, 1H), 4.54 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.0 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.50 (s, 6H), 2.96 (dd, *J* = 4.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.9 Hz, 1H), 2.75 (m, 2H), 2.55 (m, 2H), 2.43 (m, 1H), 1.67 (m, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.05 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.1, 144.6, 140.7,



130.3, 128.5, 128.3, 127.3, 126.5, 115.2, 105.8, 56.2, 55.1, 53.5, 53.3, 52.3, 42.2, 34.8, 26.5, 23.3. HRMS (ESI) calcd for  $C_{24}H_{35}N_4O_3$   $[M + H]^+$  427.2704, found 427.2706.

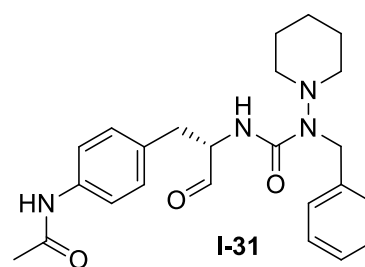
**(S)-1-Benzyl-3-(1-(4-acetylamido)benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-30)**

To a solution of **I-29** (102 mg, 0.25 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (6 mL) were added acetic anhydride (0.15 mL, 1.6 mmol) and  $Et_3N$  (50  $\mu$ L, 0.36 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 30 min and was then quenched by adding 1N HCl aqueous solution (10 mL). The mixture was extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 times 10 mL), and the combined organic extracts were washed with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  (20 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and the solvent was evaporated under vacuum. After purification by flash chromatography (gradient 1:1 to 3:1, EtOAc: Cyclohexane), **I-30** (105 mg, 94%) was obtained as a colorless oil.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.38 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 7.24-7.15 (m, 5H), 6.63 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 2H), 4.54 (d,  $J_{AB}$  = 16.0 Hz, 1H), 4.74 (d,  $J_{AB}$  = 16.0 Hz, 1H), 4.26 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.44 (s, 6H), 2.97 (dd,  $J$  = 5.3 Hz,  $J_{AB}$  = 13.9 Hz, 1H), 2.71 (m, 2H), 2.47 (m, 2H), 2.37 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 1.59 (m, 3H), 1.48 (m, 2H), 0.98 (m, 1H).  $^{13}C$  NMR (127 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  168.2, 158.0, 140.6, 136.3, 134.4, 130.0, 128.3, 127.3, 126.6, 119.7, 105.9, 56.3, 55.2, 53.5, 53.4, 52.4, 42.2, 35.0, 26.5, 24.7, 23.3. HRMS (ESI) calcd for  $C_{26}H_{37}N_4O_4$   $[M + H]^+$  469.2809, found 469.2806.



**(S)-1-Benzyl-3-(1-(4-acetamido)benzyl-2-oxo-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-31)**

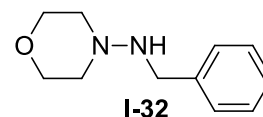
From acetal **I-30** (72 mg, 0.15 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-31** as a colorless oil (59 mg, 91 %).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.73 (s, 1H; CHO), 7.88 (br s, NHAc), 7.48 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H;  $Ar_{NHAc}$ ), 7.30-7.24 (m, 5H;  $Ar_{Phenyl}$ ), 7.15 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H;  $Ar_{NHAc}$ ), 7.02 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 1H;  $NH_{urea}$ ), 4.62 (s, 2H;  $NCH_2Ph$ ), 4.54 (m, 1H;  $NHCH$ ), 3.17 (dd,  $J$  = 6.7 Hz,  $J_{AB}$  = 13.5 Hz, 1H;  $CH_AH_BAr_{NHAc}$ ), 3.09 (dd,  $J$  = 7.4 Hz,  $J_{AB}$  = 13.5 Hz, 1H;  $CH_AH_BAr_{NHAc}$ ), 2.76 (m, 1H;  $NNCH_2pip$ ), 2.63 (m, 1H;  $NNCH_2pip$ ), 2.53 (m, 2H;  $NNCH_2pip$ ), 2.15 (s, 3H; Ac), 1.64 (m, 3H;  $CH_2pip$ ), 1.46 (m, 2H;  $CH_2pip$ ), 1.03 (m, 1H;  $CH_2pip$ ).  $^{13}C$  NMR (127 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  200.8 (CHO), 168.7 ( $CO_{Ac}$ ), 158.1 (NCON), 140.0 ( $Ar_{Phenyl}CCH_2N$ ), 137.2 ( $Ar_{NHAc}CCH_2$ ), 132.0 ( $Ar_{CNHAc}$ ), 129.8 ( $2Ar_{NHAc}$ ), 128.4 ( $2Ar_{Phenyl}$ ), 127.4 ( $2Ar_{Phenyl}$ ), 126.9 ( $Ar_{Phenyl}$ ), 120.1 ( $2Ar_{NHAc}$ ), 60.5 (NHCH), 53.6 (d, 2 x  $NNCH_2pip$ ), 42.4 ( $NCH_2Ph$ ), 34.9 ( $CH_2Ar_{NHAc}$ ), 26.4 (d, 2 x  $CH_2pip$ ), 24.6 ( $CH_3Ac$ ), 23.2 ( $CH_2pip$ ). HRMS (ESI) calcd for  $C_{24}H_{30}N_4NaO_3$   $[M + Na]^+$  445.2210, found 445.2209.





**Benzyl-morpholin-4-yl-amine (I-32)**

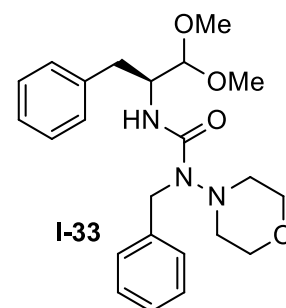
Benzaldehyde (1.74 g, 16.5 mmol) and 4-Aminomorpholine (1.59 mL, 16.5 mmol) were stirred at room temperature in anhydrous toluene (10 mL) overnight. The solvent was evaporated and a white solid was obtained.



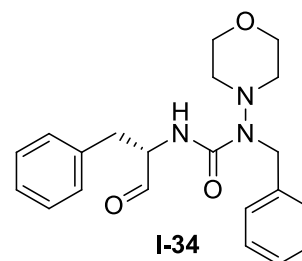
The solid was dissolved in anhydrous MeOH, acetic acid (21 mL, 367 mmol) and NaCNBH<sub>3</sub> (5.0 g, 80 mmol) were added, and stirring was continued for 2 h. Most of the solvent was removed under vacuum. Then a pH value around 8 was adjusted by adding NaHCO<sub>3</sub> (saturated aqueous solution, 30 mL) and NaOH (aqueous solution, 8 mL), and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under vacuum. After purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane), **I-32** was obtained as a yellow oil (2.67 g, 80%). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35-7.22 (m, 5H), 3.97 (s, 2H), 3.74 (m, 4H), 2.72 (m, 4H), 1.97 (br s, 1H).

**(S)-1-benzyl-1-morpholino-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-urea (I-33)**

From **I-6** + **I-32**. Colorless oil, yield : 82%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.27 (m, 2H), 7.19 (m, 3H), 7.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H; NH), 4.62 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.4 Hz, 1H), 4.50 (d, *J*<sub>AB</sub> = 16.4 Hz, 1H), 4.31 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.00 (dd, *J* = 5.0 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.8 Hz, 1H), 2.74 (m, 2H), 2.50 (m, 2H), 2.39 (m, 1H), 1.63 (m, 3H), 1.51 (m, 2H), 1.01 (m, 10H), 0.19 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.9, 154.0, 140.6, 131.2, 130.4, 128.3, 127.3, 126.5, 119.8, 105.8, 56.2, 54.9, 53.5, 53.2, 52.2, 42.1, 34.7, 26.5, 25.7, 18.2, -4.4. HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 436.2207, found 436.2203.

**(S)-1-benzyl-1-morpholino-3-(1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-urea (I-34)**

From acetal **I-33** (70 mg, 0.17 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:4 to 2:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-34** as a colorless oil (59 mg, 95 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.78 (s, 1H; CHO), 7.35-7.23 (m, 10H; Ar), 6.88 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H; NH), 4.66 (s, 2H; NCH<sub>2</sub>Ph), 4.64 (m, 1H; NHCH), 3.77 (t, *J* = 12.0 Hz, 2H; NNCH<sub>2</sub>morpholine), 3.45-3.35 (m, 2H; NNCH<sub>2</sub>morp), 3.25 (dd, *J* = 6.2 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.8 Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 3.19 (dd, *J* = 7.0 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 2.87-2.79 (m, 2H; CH<sub>2</sub>O<sub>morp</sub>), 2.57 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>O<sub>morp</sub>), 2.37 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>O<sub>morp</sub>). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.4 (CHO), 157.7 (NCON), 139.7 (PhC<sub>q</sub>), 136.4 (PhC<sub>q</sub>), 129.4 (2Ph), 128.8 (2Ph), 128.5 (2Ph), 127.5 (2Ph), 127.1

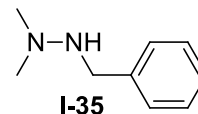


(Ph), 127.0 (Ph), 67.1 + 66.9 (CH<sub>2</sub>O<sub>morp</sub>), 60.2 (NHCH), 52.5 + 52.4 (NNCH<sub>2morp</sub>), 42.5 (NCH<sub>2</sub>Ph), 35.2 (CHCH<sub>2</sub>Ph). HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 368.1969, found 368.1964.

### 2-Benzyl-1,1-dimethylhydrazine (I-35)

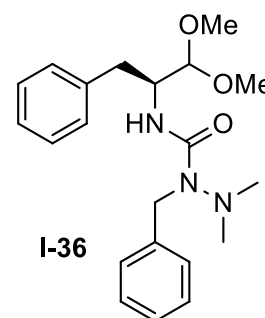
Benzaldehyde (1.58 g, 15 mmol) and *N,N*-dimethylhydrazine (2.69 g, 45 mmol) were stirred at room temperature in anhydrous ethanol (30 mL) for 1 h. The reaction was quenched by pouring the mixture into water (30 mL) and was then extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 mL). After drying the combined organic phase over MgSO<sub>4</sub> and removing the solvent under reduced pressure, the target *N,N*-dimethylhydrazone was obtained as a colorless oil (2.21 g, 33 %).

The oil was dissolved in anhydrous MeOH, acetic acid (20 mL, 345 mmol) and NaCNBH<sub>3</sub> (4.71 g, 75 mmol) were added, and stirring was continued for 2 h. Most of the solvent was removed under vacuum. Then a pH value around 8 was adjusted by adding NaHCO<sub>3</sub> (saturated aqueous solution, 30 mL) and NaOH (aqueous solution, 8 mL), and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated under vacuum. After purification by flash chromatography (50% EtOAc/cyclohexane), **I-35** was obtained as a colorless oil (1.97 g, 88 %). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33-7.19 (m, 5H), 3.89 (s, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.29 (br s, 1H).



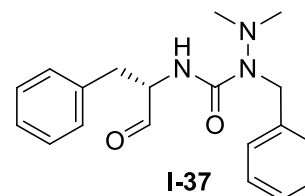
### (S)-1-Benzyl-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxyethyl)-1-dimethylamino-urea (I-36)

From **I-6** + **I-35**. Colorless oil, yield 52 %. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30-7.15 (m, 5H), 6.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H; NH), 4.60 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 16.5, 2H), 4.34 (m, 2H), 3.50 (s, 6H), 3.09 (dd, *J* = 4.3 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H), 2.80 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.25 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.9, 140.5, 138.7, 129.5, 128.3, 127.2, 126.6, 126.1, 106.0, 56.3, 55.3, 52.4, 43.9, 43.6, 41.1, 35.5. HRMS (ESI) calcd for C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 394.2101, found 394.2109.



### (S)-1-Benzyl-3-(1-benzyl-2-oxo-ethyl)-1-dimethylamino-urea (I-37)

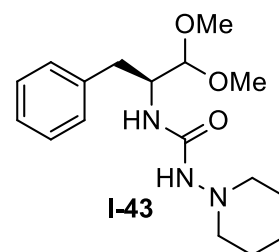
From acetal **I-36** (41 mg, 0.11 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:2 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-37** as a colorless oil (14 mg, 39 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.78 (s, 1H; CHO), 7.35-7.25 (m, 10H; Ar), 6.95 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H; NH), 4.64 (m, 1H; NHCH), 4.60 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H; NCH<sub>2</sub>Ph), 3.28 (dd, *J* = 6.8 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>Ph), 3.14 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H; CH<sub>2</sub>Ph), 2.46 (s, 3H; NNCH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H; NNCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.5 (CHO), 157.9 (NCON), 140.0 (Ar), 136.7 (Ar), 129.5 (Ar), 128.6 (Ar), 128.5 (Ar), 127.4 (Ar), 126.9



(Ar), 126.9 (Ar), 60.7 (NHCH), 43.9 (NNCH<sub>3</sub>), 41.6 (NCH<sub>2</sub>Ph), 35.7 (CH<sub>2</sub>Ph). HRMS (ESI) calcd for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 326.1863 found 326.1860.

**(S)-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-43)**

From **I-6** + N-aminopiperidine **I-42**. Colorless oil, yield : 49%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.2-7.3 (m, 5H), 6.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H; NH), 4.98 (s, 1H; NH), 4.27 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.45 (s, 6H), 3.02 (dd + bs, *J* = 4.9 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.9 Hz, 2H), 2.77 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 13.9 Hz, 1H), 2.69 (b, 1H), 2.20 (b, 1H), 2.08 (b, 1H), 1.62 (b, 5H), 1.09 (b, 1H). <sup>13</sup>C



NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.8, 138.4, 129.4, 128.3, 126.2, 105.5, 57.4, 56.2, 55.1, 51.7, 35.2, 25.8, 23.1.

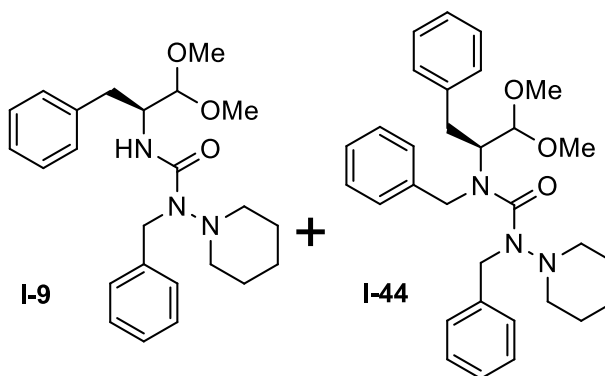
**General procedure for the double alkylation of (I-43)**

To a solution of NaH (400 mg, 16.6 mmol) in anhydrous DMF (6 mL) was added dropwise a solution of compound **I-43** (400 mg, 1.25 mmol) in anhydrous DMF (4 mL). Benzyl bromide (1.0 g, 5.85 mmol) was then added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 48 h and was then quenched by adding iso-propanol (1.5 mL) at 0 °C and then water (1.5 mL) still at 0 °C. Water (20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organic extracts were washed with LiCl (10% aqueous solution, 2 x 20 mL), then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under vacuum.

**(S)-1-benzyl-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-9) and (S)-1,3-dibenzyl-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-44)**

After purification by flash chromatography (50 % EtOAc/cyclohexane), **I-9** and **I-44** were obtained as colorless oils (**I-9**: 182 mg, 35 %, **I-44**: 77 mg, 12%).

Analysis **I-44** : <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.0-7.35 (m, 15H), 4.81 (m, 1H), 4.55 (m, 2H), 4.38 (m, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.26 (s + m, 3H), 3.02 (dd, *J* = 4.6 Hz, *J*<sub>AB</sub> = 14.0 Hz, 1H), 2.55-



2.65 (b, 4H), 1.10-1.34 (b, 6H). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.7, 139.8, 139.7, 130.1, 129.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.8, 127.0, 126.4, 126.0, 125.9, 107.5, 52.8, 43.3, 27.0, 25.5, 23.4. HRMS (ESI) calcd for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 502.3064, found 502.3061.

**(S)-1-(3-methoxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-47) and (S)-1,3-di(3-methoxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-48)**

After purification by flash chromatography (gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: cyclohexane), **I-47** and **I-48** were obtained as colorless oils (**I-47**:

146 mg, 48 %, **I-48**: 90 mg, 23%).

Analysis **I-47**:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

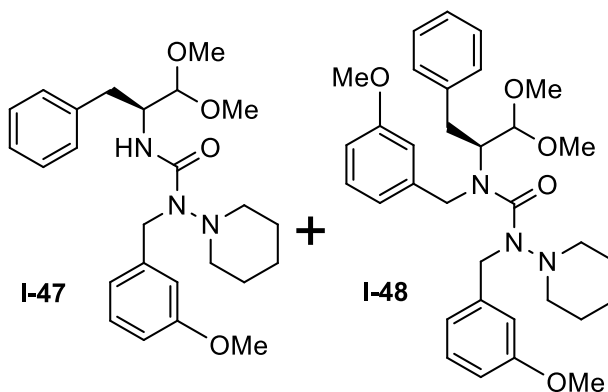
7.30-7.17 (m, 6H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (t,  $J = 8.6$

Hz, 1H), 6.65 (d,  $J_{\text{AB}} = 16.5$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J =$

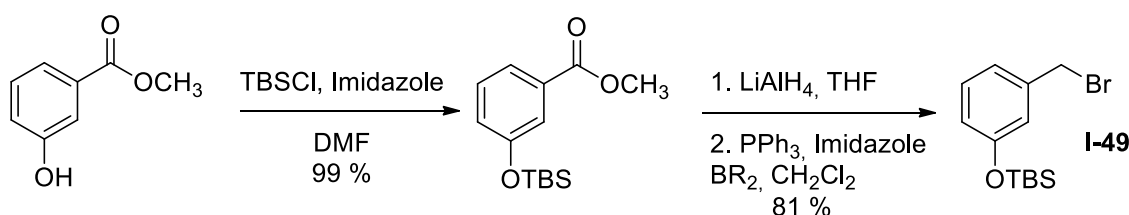
8.6 Hz, 1H), 4.49 (d,  $J_{\text{AB}} = 16.5$  Hz, 1H), 4.33 (m, 1H), 4.30 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.49 (s, 6H), 3.07 (dd,  $J = 4.6$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.8$  Hz, 1H), 2.82 (dd,  $J = 9.2$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.8$  Hz, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.46 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 1.64 (m, 3H), 1.50 (m, 2H), 1.02 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$

159.6, 157.9, 142.4, 138.7, 129.5, 129.2, 128.3, 126.1, 119.7, 112.9, 112.0, 105.8, 56.3, 55.1, 55.0, 53.3, 53.2, 52.2, 42.1, 35.4, 26.5, 23.3. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{NaO}_4$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  464.2520, found 464.2517.

Analysis **I-48**:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.18-7.23 (m, 4H), 7.06-7.13 (m, 3H), 6.86-6.87 (m, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 6.59 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.83 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (m, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.40 (s, 1H), 3.27 (s + m, 4H), 3.02 (dd,  $J = 4.6$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.8$  Hz, 1H), 2.55-2.65 (b, 4H), 1.10-1.34 (b, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162.4, 159.5, 159.4, 141.6, 139.6, 129.5, 129.0, 128.8, 128.2, 126.0, 120.4, 119.4, 113.7, 112.2, 111.9, 111.7, 107.2, 61.9, 56.6, 55.15, 55.05, 52.7, 43.3, 34.3, 25.5, 23.4. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{NaO}_5$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  584.3095, found 584.3093.



**Preparation of substituted benzyl bromide (I-49)**



Ref : S. Kwon, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16796–16797.

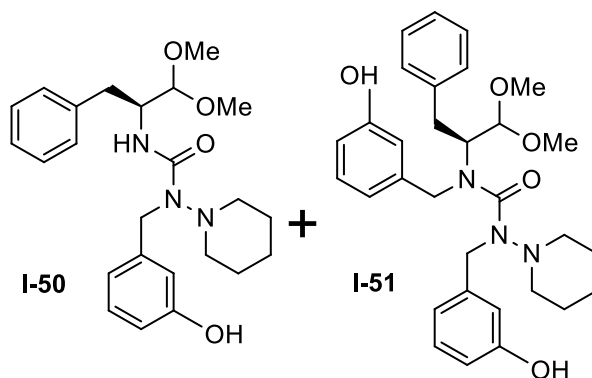
**(S)-1-(3-hydroxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-50) and (S)-1,3-di(3-hydroxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2,2-dimethoxy-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-51)**

After purification by flash chromatography (50 % EtOAc/cyclohexane), **I-50** and **I-51** were obtained as colorless oils (**I-50**: 244 mg, 46 %, **I-51**: 55 mg, 8%).

Analysis **I-50** :  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.20-7.30 (m, 5H), 7.04 (t, 1H), 6.77 (d, 1H),

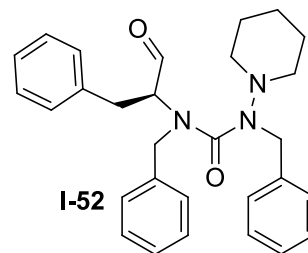
6.75 (s, 1H), 6.67 (d, 1H), 6.64 (d, 1H), 4.54 ( $d_{\text{AB}}$ , 1H), 4.41 ( $d_{\text{AB}}$ , 1H), 4.17 (m, 1H), 3.47 (s, 6H), 3.06 ( $dd_{\text{AB}}$ , 1H), 2.83 ( $dd_{\text{AB}}$ , 1H), 2.71 (d, 1H), 2.49 (t, 1H), 2.43 (d, 1H), 2.37 (t, 1H), 1.61 (m, 3H), 1.48 (m, 2H), 1.00 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.3, 156.8, 141.7, 138.4, 129.5, 129.2, 128.3, 126.2, 118.6, 114.5, 114.0, 105.8, 56.2, 55.3, 53.3, 53.1, 52.3, 42.2, 35.6, 26.4, 23.2. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{NaO}_4$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$  450.2363, found 450.2353.

Analysis **I-51**: too many impurities on NMR. MS (ESI)  $m/z$  534.2 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 100)



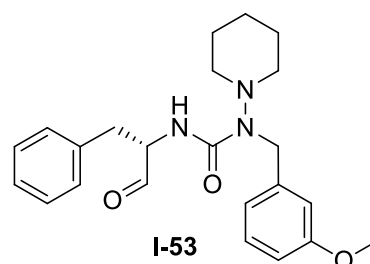
**(S)-1,3-dibenzyl-1-(1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-3-(piperidin-1-yl)urea (I-52)**

From acetal **I-44** (46 mg, 0.09 mmol). Purification by flash chromatography (gradient 1:2 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane), gave **I-52** as a colorless oil (20 mg, 48 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  9.47 (s, 1H; CHO), 7.39-7.07 (m, 15H; Ar), 4.74 (d,  $J_{\text{AB}} = 15.2$  Hz, 1H;  $\text{CHNCH}_2\text{Ph}$ ), 4.47 (m, 2H;  $\text{NNCH}_2\text{Ph}$ ), 3.83 (d,  $J_{\text{AB}} = 15.2$  Hz, 1H;  $\text{CHNCH}_2\text{Ph}$ ), 3.67 (s, 1H; NHCH), 3.33 (dd,  $J = 4.5$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 14.2$  Hz, 1H;  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 3.06 (dd,  $J = 9.8$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 14.2$  Hz, 1H;  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.82 (br, 4H;  $\text{NNCH}_2\text{pip}$ ), 1.43 (br, 6H;  $\text{CH}_2\text{pip}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  199.3 (CHO), 161.6 (NCON), 139.6 (Ar), 138.7 (Ar), 138.3 (Ar), 129.2 (Ar), 128.49 (Ar), 128.45 (Ar), 128.2 (Ar), 128.0 (Ar), 127.6 (Ar), 127.1 (Ar), 126.7 (Ar), 126.4 (Ar), 68.0 (NHCH), 53 (under solvent signal,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ), 52.95 ( $\text{NNCH}_2\text{pip}$ ), 43.6 ( $\text{NNCH}_2\text{Ph}$ ), 33.7 ( $\text{CHCH}_2\text{Ph}$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2\text{pip}$ ), 23.4 ( $\text{CH}_2\text{pip}$ ). HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  456.2646, found 456.2651.



**(S)-1-(3-methoxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2-oxo-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-53)**

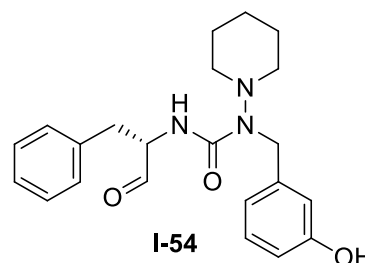
From acetal **I-47** (63 mg, 0.14 mmol). Purification by flash chromatography (50 % EtOAc/cyclohexane), gave **I-53** as a colorless oil (38 mg, 67 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.77 (s,



1H; CHO), 7.24-7.32 (m, 5H; 5Ar<sub>Phenyl</sub>+1Ar<sub>Phenol</sub>), 6.96 (d, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 6.92 (s, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 6.80 (d, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 4.61 (s, 2H; NCH<sub>2</sub>Phenol), 4.58 (m, 1H; NHCH), 3.83 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>), 3.23 (dd,  $J = 6.5$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 3.17 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 2.76 (m, 1H; NNCH<sub>2</sub>piperidine), 2.61 (m, 1H; NNCH<sub>2</sub>pip), 2.55 (m, 2H; NNCH<sub>2</sub>pip), 1.64 (m, 3H; CH<sub>2</sub>pip), 1.41 (m, 2H; CH<sub>2</sub>pip), 1.05 (m, 1H; CH<sub>2</sub>pip). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.6 (CHO), 159.7 (Ar<sub>Phenol</sub>COMe), 158.0 (NCON), 141.9 (Ar<sub>Phenol</sub>CCH<sub>2</sub>N), 136.6 (Ar<sub>Phenyl</sub>), 129.4 (2Ar<sub>Phenyl</sub>+Ar<sub>Phenol</sub>), 128.7 (2Ar<sub>Phenyl</sub>), 127.0 (Ar<sub>Phenyl</sub>), 119.8 (Ar<sub>Phenol</sub>), 113.2 (Ar<sub>Phenol</sub>), 112.2 (Ar<sub>Phenol</sub>), 60.3 (NHCH), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 53.5 (2NNCH<sub>2</sub>pip), 42.4 (CH<sub>2</sub>Phenol), 35.3 (CH<sub>2</sub>Ph), 26.4 (CH<sub>2</sub>pip), 26.3 (CH<sub>2</sub>pip), 23.2 (CH<sub>2</sub>pip). HRMS (ESI) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 396.2282, found 396.2283.

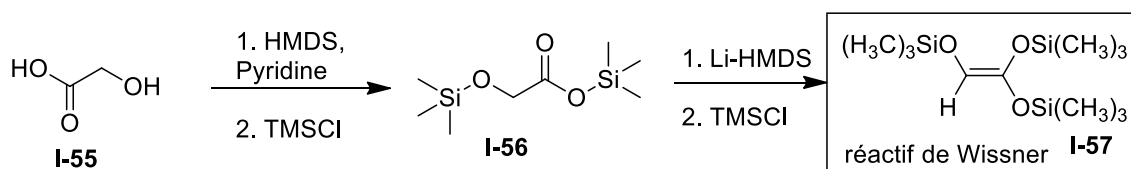
**(S)-1-(3-hydroxy-benzyl)-3-(1-benzyl-2-oxo-ethyl)-1-piperidin-1-yl-urea (I-54)**

From acetal **I-50** (78 mg, 0.18 mmol). Purification by flash chromatography (50 % EtOAc/cyclohexane), gave **I-54** as a colorless oil (41 mg, 59 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.71 (s, 1H; CHO), 7.28 (m, 5H; Ar<sub>Phenyl</sub>), 7.22 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H; NH), 7.14

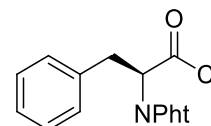


(t, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 7.00 (d, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 6.89 (s, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 6.80 (d, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 6.71 (d, 1H; Ar<sub>Phenol</sub>), 4.59 (m, 1H; NHCH), 4.56 (s, 2H; NCH<sub>2</sub>Phenol) 3.20 (dd,  $J = 6.5$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 3.16 (dd,  $J = 7.2$  Hz,  $J_{AB} = 14.0$  Hz, 1H; CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>Ph), 2.74 (m, 1H; NNCH<sub>2</sub>piperidine), 2.54 (m, 1H; NNCH<sub>2</sub>pip), 2.50 (m, 2H; NNCH<sub>2</sub>pip), 1.67 (m, 3H; CH<sub>2</sub>pip), 1.42 (m, 2H; CH<sub>2</sub>pip), 1.00 (m, 1H; CH<sub>2</sub>pip). <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.6 (CHO), 158.2 (NCON), 156.4 (Ar<sub>Phenol</sub>COH), 141.7 (Ar<sub>Phenol</sub>CCH<sub>2</sub>N), 136.3 (Ar<sub>Phenyl</sub>), 129.4 (2Ar<sub>Phenyl</sub>+Ar<sub>Phenol</sub>), 128.8 (2Ar<sub>Phenyl</sub>), 127.0 (Ar<sub>Phenyl</sub>), 119.3 (Ar<sub>Phenol</sub>), 114.6 (Ar<sub>Phenol</sub>), 114.2 (Ar<sub>Phenol</sub>), 60.3 (NHCH), 53.5 (NNCH<sub>2</sub>pip), 53.4 (NNCH<sub>2</sub>pip), 42.3 (CH<sub>2</sub>Phenol), 35.4 (CH<sub>2</sub>Ph), 26.4 (CH<sub>2</sub>pip), 26.3 (CH<sub>2</sub>pip), 23.1 (CH<sub>2</sub>pip). HRMS (ESI) calcd for C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 404.1945, found 404.1946.

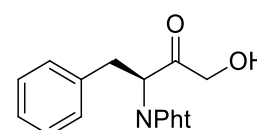
**Preparation of Wissner's reagent (I-57)**



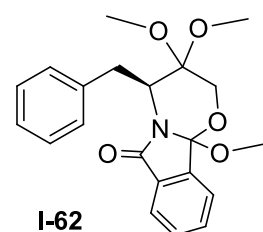
Ref : Wissner, A. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 4617.

**(S)-2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-3-phenylpropanoyl chloride (I-59)****I-59**

To a solution of acid **I-58** (2.29 g, 7.75 mmol) in benzene (30 mL) was carefully added  $\text{PCl}_5$  (1.87 g, 8.5 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ . The solution was then heated up to  $50^\circ\text{C}$  and left to stir for 2 h. The solvent was then removed by a trap to trap system. The residue was dissolved in Ether (35 mL) treated with an aq. saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  before removing the solvent under reduced pressure to yield **I-59** as a colourless solid (2.3g, 95%).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.74-7.60 (m, 4H), 7.13-7.03 (m, 5H), 5.22 (q, 1H), 3.50 (dd, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (51 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  134.6, 128.9, 128.8, 128.3, 127.3, 123.9, 61.5, 34.8 (some quaternary C missing);

**(S)-2-(4-hydroxy-3-oxo-1-phenylbutan-2-yl)isoindoline-1,3-dione (I-61)****I-61**

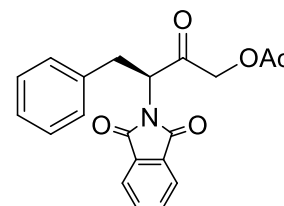
To a stirred mixture of acyl chloride **I-59** (530 mg, 1.7 mmol) and Wissner reagent (1.1 g, 3.8 mmol) was added 2 drops of  $\text{SnCl}_4$ . An exothermic reaction ensued over a 20 min period, reaching a temperature of about  $60\text{--}70^\circ\text{C}$ . After 2.5 h, the mixture was slowly poured into a mixture of dioxane (2 mL) and 0.6 N HCl aqueous solution (0.8 mL); a rapid gas evolution and exothermic reaction ensued. The mixture was maintained at  $90^\circ\text{C}$  for 15 min, saturated with NaCl and extracted with ether (2 x 10 mL). The organic extracts were washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL) and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . After drying under vacuum **I-61** was obtained as a colorless solid (450 mg, 85%).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78-7.70 (m, 4H), 7.14 (m, 5H), 5.13 (q, 1H), 4.38 (d, 1H), 3.53 (ddd, 2H), 2.98 (t, 1H);

**(4S)-4-benzyl-3,3,10b-trimethoxy-3,4-dihydro-2H-[1,3]oxazino[2,3-a]isoindol-6(10bH)-one (I-62)****I-62**

A solution of ketone **I-61** (450 mg, 1.5 mmol) in dry methanol (10 mL) was treated with trimethyl orthoformate (5 mL, 0.12 mol) and toluenesulfonic acid (0.2 g) and the resulting mixture was heated for 15 h under reflux. The volatile components were then removed in vacuo and the residue was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (10 mL). Ethyl acetate (10 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further ethyl acetate (10 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (5 mL), with a saturated aq. NaCl solution (5 mL) and then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **I-62** as a colourless solid (380 g, 71%).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78-7.74 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 2H), 7.30-7.15 (m, 5H), 5.01 (dq, 1H), 4.34 (d, 1H), 3.90 (dd, 1H), 3.29-3.20 (m, 2H), 3.26 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.01 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (51 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  132.4, 130.4, 128.7, 128.4, 126.2, 124.0, 121.7, 60.0, 52.9, 51.9, 48.8, 48.3, 33.9, 26.9 (no quat C) ;

**(S)-3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-2-oxo-4-phenylbutyl acetate (I-63)**

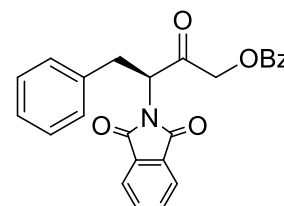
To a solution of hydroxyketone **I-61** (930 mg, 3.1 mmol) in pyridine (3 mL) was added acetic anhydride (1 mL, 10 mmol). The solution was left to stir for 3 h before a 2 M HCl solution was added (10 mL). The residue was extracted with EtOAc (30 mL x 2) and the organic phases were combined

**I-63**

and washed with a saturated aq. solution of NaHCO<sub>3</sub> (30 mL). The solvent was removed under reduced pressure to yield **I-63** as a colourless solid (800 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78-7.70 (m, 4H), 7.14 (m, 5H), 5.13 (q, 1H), 4.73 (d, 2H), 3.45 (ddd, 2H), 2.10 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (51 mHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 134.4, 129.0, 128.6, 127.3, 66.6, 57.8, 33.5, 20.3 (no quat C);

**(S)-3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)-2-oxo-4-phenylbutyl benzoate (I-64)**

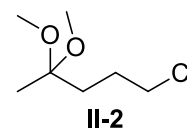
To a solution of hydroxyketone **I-61** (1.15 g, 3.9 mmol) in pyridine (4 mL) was added benzoyl chloride (0.75 g, 4.7 mmol). The solution was left to stir for 3 h before a 2 M HCl solution was added (10 mL). The residue was extracted with EtOAc (30 mL x 2) and the organic phases were combined and washed with a saturated aq. solution of NaHCO<sub>3</sub> (30 mL). The solvent

**I-64**

was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:4, EtOAc : Cyclohexane) to give **I-6a** as a colourless oil (1.14 g, 70%). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.17 (d, 1H), 8.01 (d, 2H), 7.86 (d, 1H), 7.75-7.65 (m, 5H), 5.17-7.11 (m, 5H), 5.26 (q, 1H), 5.02 (dd, 2H), 3.60 (dd, 1H), 3.44 (dd, 1H);

**Procedures for Part II****1-chloro-4,4-dimethoxypentane (II-2)**

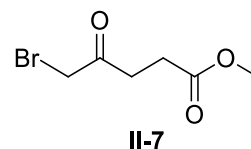
A solution of ketone **II-1** (24.1 g, 200 mmol) in dry methanol (200 mL) was treated with trimethyl orthoformate (20 mL, 0.5 mol) and toluenesulfonic acid (0.3 g) and the resulting mixture was heated for 15 h under reflux. The volatile components were then removed in vacuo and the residue was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (100 mL). Ethyl acetate (100 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL), with a saturated aq. NaCl solution (50 mL) and then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by distillation (20 mbar, 91-96°C) gave **II-25** as a colorless oil (25.3 g, 80%). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.55 (t, 2H), 3.17 (d, 6H), 1.76 (m, 4H), 1.27 (s, 3H);

**II-2**

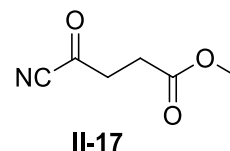


**Methyl 5-bromo-4-oxopentanoate (II-7)**

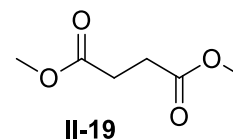
To a solution of levulinic acid II-6 (25.3 mL, 250 mmol) in MeOH (125 mL), was slowly and carefully added bromine (12.9 mL, 250 mmol). The resulting solution was heated to 40 °C and left to stir overnight. The solution was concentrated under reduced pressure (until 100 mbar) and diluted with Et<sub>2</sub>O (150 mL). The solution was washed with water (150 mL) and then with a saturated aq. solution of NaHCO<sub>3</sub> (150 mL) before removing the solvent under reduced pressure. The crude product was dissolved in Et<sub>2</sub>O (100 mL) and Cyclohexane (100 mL) and the resulting mixture was brought down to – 40 °C for 2 h. The cristaline needles were filtered and stored in the freezer to yield II-7 (16.5 g, 32 %). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.93 (s, 2H), 3.64 (s, 3H), 2.92 (t, 2H), 2.61 (t, 2H); <sup>13</sup>C NMR (51 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 200.6, 172.8, 52.0, 34.5, 34.2, 28.1;

**Methyl 4-cyano-4-oxobutanoate (II-17)**

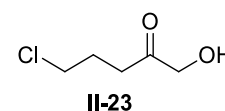
To a solution of acyl chloride II-16 (10.2 g, 67.7 mmol) in acetonitrile (65 mL) was added CuCN (14.4 g, 160 mmol). The solution was then heated to 90 °C for 45 min and then at 70 °C for 21 h. The solvent was then removed and the residue was dissolved in Et<sub>2</sub>O (100 mL). The solution was filtered over a pad of celite and active charcoal and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by distillation gave II-17 as a colourless oil (2.4 g, 25 %). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.70 (s, 3H), 3.05 (t, 2H), 2.73 (t, 2H); <sup>13</sup>C NMR (51 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175.3, 171.3, 113.0, 52.4, 39.9, 27.0;

**Dimethyl succinate (II-19)**

A solution of ketone II-17 (0.35 g, 2.5 mmol) in dry methanol (10 mL) was treated with trimethyl orthoformate (1 mL) and toluenesulfonic acid (50 mg) and the resulting mixture was heated for 15 h under reflux. The volatile components were then removed in vacuo and the residue was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (5 mL). Ethyl acetate (10 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further ethyl acetate (10 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (5 mL), with a saturated aq. NaCl solution (5 mL) and then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to yield II-19 as a colourless oil (0.36 g, quant). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.69 (s, 6H), 2.63 (s, 4H); <sup>13</sup>C NMR (51 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.1, 51.9, 28.9;

**5-chloro-1-hydroxypentan-2-one (II-23)**

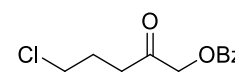
To a stirred mixture of 4-chlorobutyryl chloride II-22 (10.0 g, 71 mmol) and Wissner reagent (30.5 g, 105 mmol) was added 10 drops of SnCl<sub>4</sub>. An exothermic reaction ensued over a 20 min period, reaching a temperature of about 60-70 °C. After 2.5 h, the mixture was slowly poured into a mixture of dioxane (100 mL) and 0.6 N HCl aqueous solution (40 mL); a rapid gas evolution and exothermic reaction ensued. The mixture was maintained at 90°C for



15 min, saturated with NaCl and extracted with ether (2 x 200 mL). The organic extracts were washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (250 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After drying under vacuum **II-23** was obtained as a colorless oil (5.46 g). NMR analysis showed good purity. The different aqueous phases were concentrated and both extracted with ether (2 x 100 mL) to recover 4.2 g of a yellow oil. Purification by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-23** as a colorless oil (3.5 g) which brought the yield to 92 % (8.96 g). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.24 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.1 (t, J = 4.9 Hz, 0.4 (OH)), 2.59 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.10 (tt, J = 6.5 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 208.6, 67.1, 44.1, 35.1, 26.0;

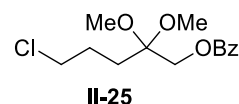
#### 5-chloro-2-oxopentyl benzoate (**II-24**)

Benzoyl chloride (6.75 g, 48 mmol) was added to an ice-cooled solution of the hydroxy ketone **II-23** (5.46 g, 40 mmol) in pyridine (12 mL). After being stirred overnight, the reaction was poured into water (20 mL) and extracted with dichloromethane (2 x 50 mL). The combined organic layers were washed with aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> (60 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent followed by purification by flash chromatography (Silica gel, 1:9, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-24** as a colorless oil (9.33 g, 97%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.60 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.47 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.90 (s, 2H), 3.61 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.72 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.12 (tt, J = 6.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203.1, 165.9, 133.6, 129.9, 129.1, 128.6, 68.5, 44.2, 35.6, 25.8;



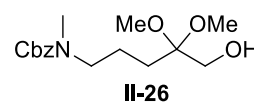
#### 5-chloro-2,2-dimethoxypentyl benzoate (**II-25**)

A solution of ketone **II-24** (9.33 g, 38.9 mmol) in dry methanol (150 mL) was treated with trimethyl orthoformate (22 mL, 0.2 mol) and toluenesulfonic acid (0.25 g) and the resulting mixture was heated for 15 h under reflux. The volatile components were then removed in vacuo and the residue was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL). Ethyl acetate (100 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further ethyl acetate (100 mL). The combined organic extracts were washed with a saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (50 mL), with a saturated aq. NaCl solution (50 mL) and then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-25** as a colorless oil (7.16 g, 64%) and some starting material 20 was also recovered (2.47 g, 26%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.05 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.58 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.57 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.27 (s, 6H), 1.94 (m, 2H), 1.87 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.9, 133.3, 129.8, 128.5, 100.8, 61.7, 48.3, 45.1, 30.0, 26.9;



#### Benzyl (5-hydroxy-4,4-dimethoxypentyl)(methyl)carbamate (**II-26**)

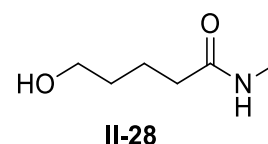
To a solution of **II-25** (3.05 g, 10.6 mmol) in EtOH (10 mL) was a solution of methylamine in EtOH (5 mL, 40 mmol). The mixture was heated up to 130 °C in a MicroWave



apparatus for 40 min (9-10 bar). NaOH (446 mg, 11 mmol) were added and the solvents were then removed. The residue was dissolved in dry MeOH (20 mL) and to the resulting solution was added Et<sub>3</sub>N (1.48 mL, 11.7 mmol) and then benzylchloroformate (1.52 mL, 11.7 mmol). The reaction was left to stir at room temperature for 2 hours before removal of the solvent. The residue was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (30 mL). CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:1, EtOAc: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gave **II-26** as a colourless oil (2.71 g, 82 % over two steps). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.30-7.36 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.50-3.56 (m, br, 2H), 3.27-3.31 (m, br, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.17 (s, 3H), 2.91 (s, 3H), 1.57-1.66 (m, br, 4H); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.5, 136.9, 128.5, 128.0, 127.9, 101.9, 67.1, 61.3, 49.0 and 48.8, 48.3, 34.8 and 33.9, 28.9 and 28.4, 22.2 and 21.5;

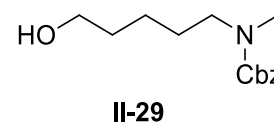
### 5-hydroxy-N-methylpentanamide (**II-28**)

A solution of ~8.03 M methyl amine in ethanol (10 mL, 80 mmol) was added to a solution of δ-valerolactone (5.50 g, 55 mmol) in THF (50 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 48 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, 1:9, MeOH : EtOAc) gave **II-28** as a colourless oil (7.17 g, 99 %). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.54 (br, 1H), 3.58 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.72 (d, 3H), 2.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.66-1.54 (m, 4H);



### Benzyl (5-hydroxypentyl)(methyl)carbamate (**II-29**)

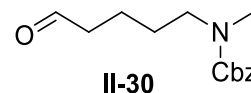
To a solution of **II-28** (2.60 g, 20 mmol) in dry THF (100 mL) was slowly added LiAlH<sub>4</sub> (1.52 g, 40 mmol) at 0°C. The slurry mixture was then heated up to reflux for 3h. The mixture was then cooled down at 0 °C and quenched by adding slowly and carefully water (1.5 mL), then a 10 % NaOH aqueous solution (3.0 mL) and then water again (4.5 mL). The resulting mixture was then filtered over a celite pad and the solvent was then removed under reduced pressure. The crude amine was obtained as a colorless oil (2.34 g, quant). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.58 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.7-1.3 (m, 6H);



To a solution of amine (0.94 g, 8.0 mmol) and Et<sub>3</sub>N (1.35 mL, 9.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added CbzCl (1.4 mL, 9.6 mmol) at rt. The mixture was left to stir for 2h. The solution was treated with 1 M HCl and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 15 mL). The combined organic phases were washed with a saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (10 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-49** as a colorless oil (2.78 g, 85 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.60 (dm, 2H), 3.28 (m, 2H), 2.91 (s, 3H), 1.56 (m, 4H), 1.33 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR

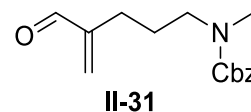
(127 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  156.4, 137.0, 128.8, 128.5, 128.0, 67.0, 62.7, 49.0 and 48.7, 34.7 and 34.0, 32.4, 27.8 and 27.3, 22.9 and 22.8;

### Benzyl methyl(5-oxopentyl)carbamate (**II-30**)



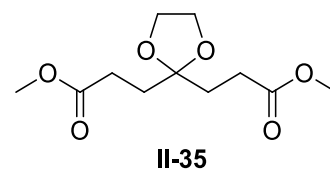
A solution of DMSO (1.45 mL, 20.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added to a solution of oxalyl chloride (1.34 mL, 15.6 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) at -78°C over 30 min. The mixture was left to stir at -78°C for 1 h before the addition of a solution of alcohol **II-29** (2.80 g, 11.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) over 1 h at -78°C. The mixture was then left to stir at -78°C for 1 h before the addition of Et<sub>3</sub>N (6 mL) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) over 30 min at -78°C. The mixture was left to stir at -78°C for 1 h before being allowed to go back to rt. The mixture was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (30 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 30 mL). The combined organic extracts were washed with brine (50 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure aldehyde **II-30** as a colorless oil (2.82 g, 97%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.72 (d, 1H), 7.35 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.30 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.48-2.40 (dm, 2H), 1.56 (m, 4H); (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  202.3 and 202.0, 156.4, 137.0, 128.8, 128.5, 128.0, 67.1, 67.0, 48.6 and 48.3, 43.5, 34.6 and 34.0, 27.4 and 26.9;

### Benzyl (4-formylpent-4-en-1-yl)(methyl)carbamate (**II-31**)



To a solution of pyrrolidine (100  $\mu$ L, 1.1 mmol) and *p*-(dimethylamino)benzoic acid (363 mg, 2.2 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11 mL) were added formaldehyde (35.0% solution in H<sub>2</sub>O, 0.87 mL, 11 mmol) and aldehyde **II-30** (2.82 g, 11 mmol). The reaction was rapidly heated to 45°C and stirred for 30 min. The mixture was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (25 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 25 mL). The combined organic extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-31** as a colorless oil (1.82 g, 64 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.51 (d, 1H), 7.35 (m, 5H), 6.25 (d, 1H), 5.97 (d, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.29 (m, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 1.70 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.6 and 194.4, 156.3, 149.4, 134.6, 134.2, 128.5, 128.0, 127.8, 67.1 and 67.0, 48.7 and 48.2, 34.7 and 34.0, 26.1 and 25.6, 25.1;

### Dimethyl 3,3'-(1,3-dioxolane-2,2-diyl)dipropionate (**II-35**)

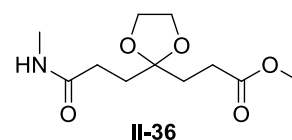


A solution of diethyl 4-oxopimelate **II-32** (28.0 g, 122 mmol) in dry methanol (150 mL) was treated with trimethyl orthoformate (60 mL, 0.6 mol) and toluenesulfonic acid (1.3 g) and the resulting mixture was heated for 24 h under reflux. The volatile components were then removed in vacuo and the residue was neutralized with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> solution (25 mL). Diethyl ether (40 mL) was added, the

layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further ether (40 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. The intermediate dimethylacetal **II-34** was obtained as a colorless oil. (28.5 g, 94 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.69 (s, 6H), 3.17 (s, 6H), 2.32 (t, 4H), 1.92 (t, 4H).

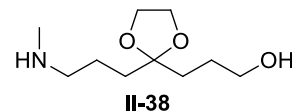
The crude product obtained (28.5 g, 115 mmol) was heated with ethylene glycol (6.7 mL, 120 mmol), trimethyl orthoformate (3.0 mL, 27 mmol), and zinc chloride (25 mg) at 100 °C in a distillation apparatus. Most of the methanol formed was distilled at atmospheric pressure after 20 h. A vacuum was subsequently applied to remove the volatile components. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-35** as a colorless oil (23.43 g, 83 %) and the corresponding unprotected ketone (2.88 g, 12 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.95 (s, 4H), 3.69 (s, 6H), 2.40 (t, 4H), 2.00 (t, 4H).

**Methyl 3-(2-(3-(methylamino)-3-oxopropyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propanoate (II-36)**



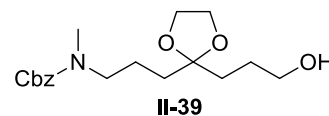
To a solution of **II-35** (5.2 g, 21.1 mmol) in MeOH was added potassium cyanide (150 mg, 2.3 mmol) and a solution of methylamine in EtOH (2.65 mL, 21.2 mmol). The mixture was heated up to 90°C in a MicroWave apparatus for 3h (3-4 bar). The solvents were then removed and the residue was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (25 mL). EtOAc (25 mL) was added, the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further EtOAc (2 x 25 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, 100% EtOAc) gave **II-35** as a colourless oil (2.08 g, 41 %) and then **II-36** as colorless oil (2.34 g, 45 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.64 (brs, 1H), 3.95 (s, 4H), 3.68 (s, 3H), 2.81 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 3H), 2.40 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 2.26 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 1.99 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 1.98 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.0, 173.1, 110.1, 65.1, 51.6, 32.5, 31.9, 30.9, 28.6, 26.4. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NNaO}_5$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  268.1155, found 268.1154.

**3-(2-(3-(methylamino)propyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propan-1-ol (II-38)**



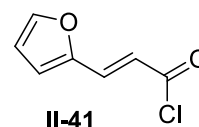
To a solution of **II-36** (3.25 g, 13.1 mmol) in dry THF (125 mL) was slowly added  $\text{LiAlH}_4$  (2.0 g, 52.6 mmol) at 0 °C. The slurry mixture was then heated up to reflux for 12h. The mixture was then cooled down at 0°C and quenched by adding slowly and carefully water (2.0 mL), then a 10 % NaOH aqueous solution (4.0 mL) and then water again (6.0 mL). The resulting mixture was then filtered over a celite pad and the solvent was then removed under reduced pressure. The crude **II-38** was obtained as a colorless oil (2.75 g, quant).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.97 (s, 4H), 3.65 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 2.59 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.54-1.78 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.6, 64.9, 63.0, 52.2, 36.4, 34.7, 33.7, 27.1, 24.2. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{NO}_3$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  204.1594, found 204.1591.

**Benzyl (3-(2-(3-hydroxypropyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propyl)(methyl)carbamate (II-39)**



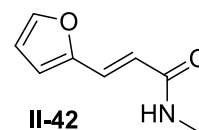
To a solution of **II-38** (1.04 g, 5.1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) was added successively  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.4 mL, 10 mmol) and  $\text{Cbz-Cl}$  (0.80 mL, 5.6 mmol) at 0 °C. The mixture was left to stir at room temperature overnight. The mixture was then neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (30 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 30 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:1,  $\text{EtOAc}$ : Cyclohexane) gave **II-30** as a colorless oil (1.29 g, 75 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ . 7.37 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 3.95 (m, 4H), 3.63 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 2.92 (s, 3H), 1.66 (m, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.3, 137.0, 128.5, 127.9, 111.3, 67.0, 65.0, 62.9, 49.1 and 48.8, 34.0, 34.6 and 33.8, 27.0, 22.3 and 21.9. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{NO}_5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  338.1962, found 338.1965.

**(E)-3-(furan-2-yl)acryloyl chloride (II-41)**



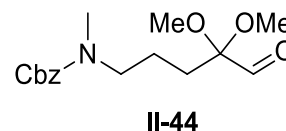
To a solution of acrylic acid **II-40** (1.11 g, 8 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) is added thionyl chloride (1.16 mL, 16 mmol) dropwisely. The resulting mixture is then heated to reflux for 2 h before removing the solvent by a trap to trap system. The crude material is directly engage in the next step.

**(E)-3-(furan-2-yl)-N-methylacrylamide (II-42)**



To a solution of **II-41** (crude, 8 mmol) in THF (15 mL) is added a solution of  $\text{MeNH}_2$  in  $\text{EtOH}$  (3 mL, 8.02 M, 24 mmol). The reaction is left to stir for 20 min. The solution is then treated with a saturated aq. solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25 mL) and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 25 mL). The combined organic phases are then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent is removed under reduced pressure to yield **II-42** as a light brown solid (1.07 g, 90 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.45-7.40 (s+d, 2H), 6.54 (d, 1H), 6.46 (dd, 1H), 6.32 (d, 1H), 5.77 (brs, 1H), 2.95 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.5, 151.3, 143.9, 127.8, 118.2, 113.6, 112.1, 26.5;

**Benzyl (4,4-dimethoxy-5-oxopentyl)(methyl)carbamate (II-44)**

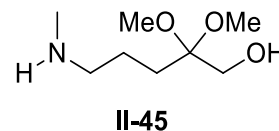


A solution of DMSO (0.22 mL, 2.9 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) was added to a solution of oxalyl chloride (0.20 mL, 2.25 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) at -78°C over 30 min. The mixture was left to stir at -78°C for 1 h before the addition of a solution of alcohol **II-26** (0.50 g, 1.61 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) over 1 h at -78°C. The mixture was then left to stir at -78°C for 1 h before the addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.90 mL) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) over 30 min at -78°C. The mixture was left to stir at -78°C for 1 h before being allowed to go back to rt. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (4 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (10 mL) and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed

under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel, gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-44** as a colorless oil (225 mg, 45%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.43 (d,  $J$  = 17.6 Hz, 1H), 7.35-7.28 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.27-3.23 (m, 8H), 2.88 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 1.77-1.71 (dm, 2H), 1.45 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.0, 156.3, 136.9, 128.5, 128.0, 127.9, 101.9, 67.2 and 67.1, 49.7, 48.8 and 48.5, 34.7 and 33.9, 28.6, 21.2 and 20.8;

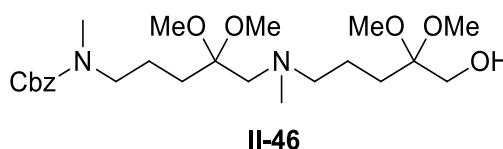
#### 2,2-dimethoxy-5-(methylamino)pentan-1-ol (**II-45**)

To a solution of Cbz-protected amine **II-26** (0.50 g, 1.61 mmol) in MeOH (10 mL) was added Pd/C 5% Degussa Type (100 mg). The reaction mixture



was then subjected to an  $\text{H}_2$  atmosphere at ambient pressure and rt and left to stir for 2 h. The mixture was then filtered over a celite pad which was rinsed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure amine **II-45** (280 mg, quant).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.53 (s, 2H), 3.21 (s, 6H), 2.61 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.75 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.51 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  102.7, 61.0, 52.1, 48.2, 36.3, 29.1, 22.9;

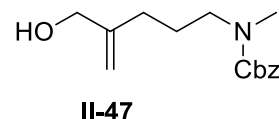
#### Benzyl (5-((5-hydroxy-4,4-dimethoxypentyl)(methyl)amino)-4,4-dimethoxypentyl)(methyl)carbamate (**II-46**)



To a solution of amine **II-45** (106 mg, 0.60 mmol) and aldehyde **II-44** (215 mg, 0.70 mmol) in MeOH (10 mL) was added a solution of  $\text{BH}_3$ -pyridine in THF (1 mL, 1.0 mmol). The reaction mixture was left to stir for 36 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken up in a mixture of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) and saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (10 mL). This mixture was left to neutralize under vigorous agitation for 30 min before being extracted. The aqueous phase was further extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 10 mL) and the combined organic phases were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was evaporated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-46** as a colorless oil (80 mg, 24 %). Unpure product  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35-7.25 (m, 5H), 5.10 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 3.26 (m, 2H), 3.19 (s, 6H), 3.15-3.10 (m, 6H), 2.91 (s, 3H), 2.40 (m, 3H), 2.26 (m, 2H), 1.64 (m, 4H), 1.49 (m, 4H); MS (ESI) for  $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  471.3.

#### Benzyl (4-(hydroxymethyl)pent-4-en-1-yl)(methyl)carbamate (**II-47**)

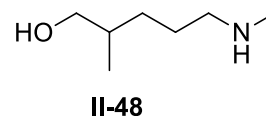
To a solution of acrolein **II-31** (280 mg, 1.07 mmol) in MeOH (20 mL) was added  $\text{NaBH}_4$  (82 mg, 2.14 mmol) over 10 min at 0 °C. The reaction was left



to stir at 0 °C for 30 min. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (30 mL).  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) was added and the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 40 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure to yield the pure alcohol **II-47** as a colorless oil (271 mg, 96%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 5.03 (d, 1H), 4.86 (d, 1H), 4.04 (d, 2H),

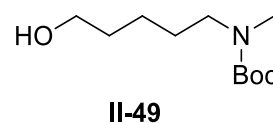
3.30 (m, 2H), 2.92 (s, 3H), 2.05 (m, 2H), 1.73 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.4, 148.3, 137.0, 128.5, 128.0, 127.9, 109.9 and 109.7, 67.0, 66.1 and 65.9, 48.8 and 48.5, 34.7 and 34.0, 29.8, 25.9 and 25.4;

### 2-methyl-5-(methylamino)pentan-1-ol (II-48)



To a solution of Cbz-protected amine **II-47** (269 mg, 1.02 mmol) in MeOH (10 mL) was added Pd/C 5% Degussa Type (100 mg). The reaction mixture was then subjected to an  $\text{H}_2$  atmosphere at atm. pressure and rt and left to stir for 3 days. The mixture was then filtered over a celite pad which was rinsed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure amine **II-48** (131 mg, quant).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) no peak for methylene bond; MS (ESI) found 132.2.

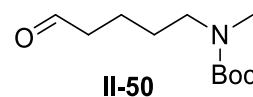
### Tert-butyl (5-hydroxypentyl)(methyl)carbamate (II-49)



To a solution of **II-28** (2.60 g, 20 mmol) in dry THF (100 mL) was slowly added  $\text{LiAlH}_4$  (1.52 g, 40 mmol) at  $0^\circ\text{C}$ . The slurry mixture was then heated up to reflux for 3h. The mixture was then cooled down at  $0^\circ\text{C}$  and quenched by adding slowly and carefully water (1.5 mL), then a 10 % NaOH aqueous solution (3.0 mL) and then water again (4.5 mL). The resulting mixture was then filtered over a celite pad and the solvent was then removed under reduced pressure. The crude amine was obtained as a colorless oil (2.34 g, quant).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.58 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 2.58 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.7-1.3 (m, 6H);

To a solution of amine (1.76 g, 15.1 mmol) in THF (100 mL) was added  $\text{Boc}_2\text{O}$  (4.36 g, 20 mmol) at rt. The mixture was left to stir for 12h. The solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:4 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-49** as a colorless oil (2.78 g, 85 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.64 (q,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.21 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.35 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.0, 79.2, 62.8, 48.8 and 48.2, 34.1, 32.4, 28.5, 27.7 and 27.3, 22.9 and 22.7;

### Tert-butyl methyl(5-oxopentyl)carbamate (II-50)

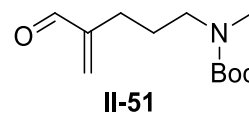


A solution of DMSO (1.45 mL, 20.6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) was added to a solution of oxalyl chloride (1.34 mL, 15.6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  over 30 min. The mixture was left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before the addition of a solution of alcohol **II-49** (2.41 g, 11.1 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL) over 1 h at  $-78^\circ\text{C}$ . The mixture was then left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before the addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (6 mL) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) over 30 min at  $-78^\circ\text{C}$ . The mixture was left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before being allowed to go back to rt. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (30 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 30 mL). The combined organic extracts were washed with brine (50 mL) and dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure



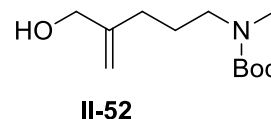
to yield the pure aldehyde **II-50** as a colorless oil (2.36 g, 97%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.72 (d, 1H), 3.30 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 2.49–2.39 (dm, 2H), 1.56 (m, 4H), 1.44 (s, 9H);

***Tert*-butyl (4-formylpent-4-en-1-yl)(methyl)carbamate (II-51)**



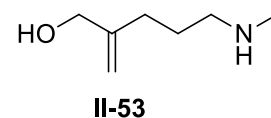
To a solution of pyrrolidine (100  $\mu\text{L}$ , 1.1 mmol) and *p*-(dimethylamino)benzoic acid (363 mg, 2.2 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (11 mL) were added formaldehyde (35.0% solution in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.87 mL, 11 mmol) and aldehyde **II-50** (2.36 g, 11 mmol). The reaction was rapidly heated to  $45^\circ\text{C}$  and stirred for 30 min. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (25 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 25 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:4, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-51** as a colorless oil (1.64 g, 64 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.53 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.22 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.44 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  194.5, 155.8, 149.6, 164.5 and 134.1, 79.3, 48.5 and 48.0, 34.2, 28.5, 26.0 and 25.7, 25.2;

***Tert*-butyl (4-(hydroxymethyl)pent-4-en-1-yl)(methyl)carbamate (II-52)**



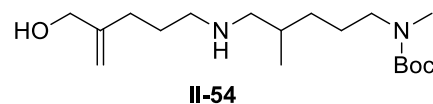
To a solution of acrolein **II-51** (593 mg, 2.61 mmol) in MeOH (40 mL) was added  $\text{NaBH}_4$  (198 mg, 5.22 mmol) over 10 min at  $0^\circ\text{C}$ . The reaction was left to stir at  $0^\circ\text{C}$  for 30 min. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (30 mL).  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) was added and the layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 40 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure to yield the pure alcohol **II-52** as a colorless oil (606 mg, quant).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.05 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.22 (m, 2H), 2.83 (s, 3H), 2.05 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.44 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156.1, 148.3, 109.7, 79.4, 66.0, 48.8 and 48.0, 34.2, 29.8, 28.5, 26.0 and 25.6;

**5-(methylamino)-2-methylenepentan-1-ol (II-53)**



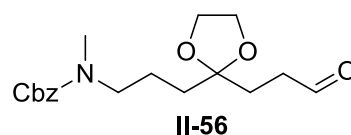
To a solution of alcohol **II-52** (590 mg, 2.57 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was added TFA (4 mL) and the reaction mixture was left to stir for 30 min. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was neutralized with saturated aq.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  solution (10 mL) and the aqueous phase was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 10 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure amine **II-53** as a colorless oil (295 mg, 90%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.04 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.20 (m, 2H), 2.67 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.18 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 1.73 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.9, 110.8, 66.4, 50.9, 35.7, 30.1, 27.6;

**tert-butyl (5-((4-(hydroxymethyl)pent-4-en-1-yl)amino)-4-methylpentyl)(methyl)carbamate (II-54)**



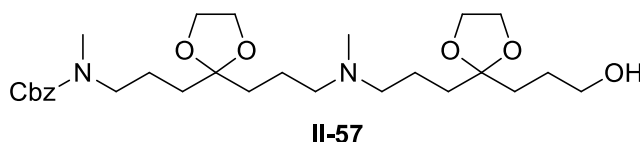
To a solution of amine **II-53** (161 mg, 1.24 mmol) and aldehyde **II-51** (320 mg, 1.37 mmol) in MeOH (5 mL) was added NaCNBH<sub>3</sub> (314 mg, 5 mmol) and AcOH (0.1 mL). The reaction mixture was left to stir for 3 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was taken up in Et<sub>2</sub>O and washed with a 2 M aq. solution of NaOH (2 x 5 mL), then with brine (5 mL) and the solvent was removed by reduced pressure. MS (ESI) found 329.3.

**Benzyl methyl(3-(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propyl)carbamate (II-56)**



To a solution of alcohol **II-39** (1.95 g, 5.8 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) was added at 0 °C Dess-Martin Periodinane (3.70 g, 8.7 mmol) over 20 min. The mixture was then left to stir for 1 h at rt. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was taken up in Et<sub>2</sub>O (50 mL) and treated with a saturated aqueous solution of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:NaHCO<sub>3</sub> (1:1) (30 mL). The organic layer was then washed with water (30 mL), brine (30 mL) and then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was then removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-56** as a colorless oil (1.83 g, 93 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.71 (s, 1H), 7.37 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 3.91 (d, J = 9.2 Hz, 4H), 3.31 (m, 2H), 2.94 (s, 3H), 2.44 (m, 2H), 2.02 (m, 2H), 1.62 (m, 4H). HRMS (ESI) calcd for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 336.1805, found 336.1816.

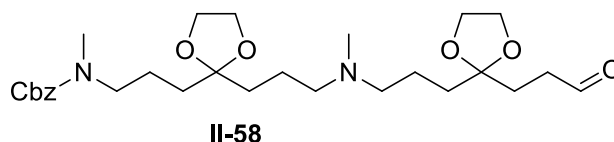
**Dimer (II-57)**



To a solution of amine **II-38** (345 mg, 1.70 mmol) and aldehyde **II-56** (786 mg, 2.35 mmol) in MeOH (20 mL) was added NaCNBH<sub>3</sub> (500 mg, 7.96 mmol) and AcOH (100 μL, 1.75 mmol). The mixture was left to stir for 2h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography directly with no prior extraction due to the high water solubility of the dimer. Purification by flash chromatography (C18, gradient 0% to 10% MeCN in Water) gave **II-57** as a colourless oil (230 mg, 26 %). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.40-7.35 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 4.00 (brs, 8H), 3.59 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.34 (m, 2H), 3.16 (m, 4H), 2.96 (d, J = 12.8 Hz, 3H), 2.87 (3H), 1.83-1.61 (m, 16H), 0.44 (q, BH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (127 MHz, MeOD) δ 156.9, 137.0, 128.4, 127.9 and 127.8 (2C), 127.5, 110.8, 110.6, 67.0, 64.8 (d, 4C), 61.7, 56.2 (d, 2C), 48.9 and 48.6, 39.3, 33.7, 33.2 (d, 4C), 26.8, 22.2 and 21.7, 18.7; HRMS (ESI) calcd for C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M + H]<sup>+</sup> 523.3378, found 523.3381.

**O-activated dimer (II-58)**

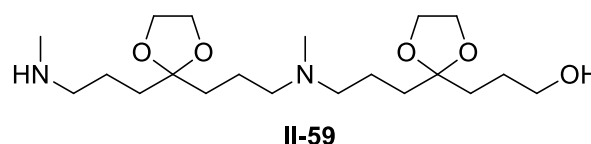
A solution of DMSO (0.20 mL, 2.9 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was added to a solution of



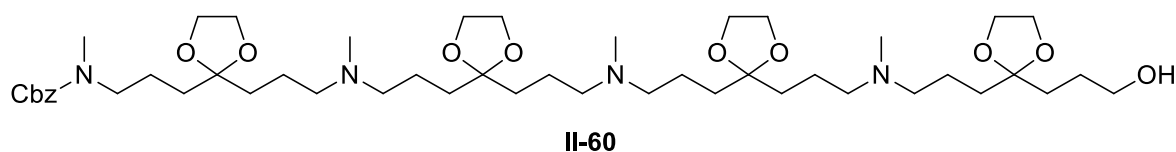
oxalyl chloride (0.20 mL, 2.25 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  over 30 min. The mixture was left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before the addition of a solution of alcohol **II-57** (380 mg, 0.73 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) over 1 h at  $-78^\circ\text{C}$ . The mixture was then left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before the addition of  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.90 mL) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) over 30 min at  $-78^\circ\text{C}$ . The mixture was left to stir at  $-78^\circ\text{C}$  for 1 h before being allowed to go back to rt. The mixture was neutralized with saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  solution (4 mL). The layers were separated, and the aqueous phase was extracted with further  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 20 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure. Purification was not performed to avoid loss of product and engaged in the next step. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  521.3221, found 521.3217.

**N-protected dimer (II-59)**

To a solution of Cbz-protected amine **II-57** (373 mg, 0.71 mmol) in MeOH (80 mL) was added



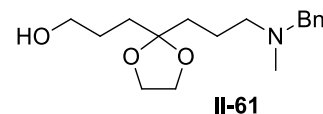
$\text{Pd/C}$  5% Degussa Type (200 mg). The reaction mixture was then subjected to an  $\text{H}_2$  atmosphere at 10 bar and rt and left to stir for 3 days. The mixture was then filtered over a celite pad which was rinsed with MeOH. The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure amine **II-59** (236 mg, quant).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.04 (s, 4H), 4.00 (s, 4H), 3.59 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.13 (m, 3H), 3.05 (m, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 1.79 (m, 14H), 1.63 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  110.8, 110.1, 65.0, 64.8, 61.7, 56.3, 56.2, 49.2, 39.4, 33.4, 33.3, 33.2, 32.4, 26.8, 20.5, 18.9, 18.8; HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  389.3010, found 389.3006.

**Tetramer (II-60)**

To a solution of amine **II-59** (236 mg, 0.61 mmol) and aldehyde **II-58** (490 mg, 0.94 mmol) in MeOH (20 mL) was added  $\text{NaCNBH}_3$  (250 mg, 3.98 mmol) and AcOH (50  $\mu\text{L}$ , 0.88 mmol). The mixture was left to stir for 6h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography directly with no prior extraction due to the high water solubility of the tetramer. Purification by flash chromatography (C18, gradient 0% to 10% MeCN in Water) gave **II-60** as a colourless oil (25 mg, 5 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7.40-7.35 (m, 5H), 5.15 (s, 2H), 4.04 and 4.00 (m, 16H), 3.59 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.34 (m, 2H + MeOD), 3.21 (m, 12H), 2.98-2.90 (m + s, 12H), 1.84-1.64 (m, 32H), 0.44 (q, boron salt);  $^{13}\text{C}$  NMR (127 MHz, MeOD)  $\delta$  156.9, 137.1, 128.4, 127.9 and 127.8, 127.5, 110.8, 110.6, 110.1 (2C), 67.0, 64.9 (4C), 64.8 (4C), 61.8, 56.2 (2C), 56.1 (2C), 48.9

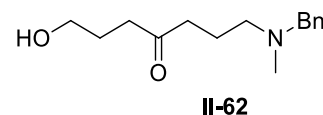
and 48.6, 39.3, 33.7 and 33.2, 33.1, 26.8, 22.2 and 21.8, 18.8, 18.7; HRMS (ESI) calcd for  $C_{48}H_{86}N_4O_{11}$   $[M + 2H]^{2+}$  447.3141, found 447.3155.

**3-(2-(3-(benzyl(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propan-1-ol (II-61)**



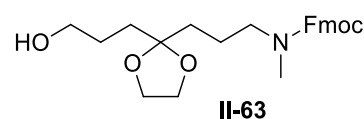
To a solution of amine **II-38** (565 mg, 2.8 mmol) and benzaldehyde (400 mg, 3.8 mmol) in MeOH (20 mL) was added  $NaCNBH_3$  (500 mg, 7.96 mmol) and AcOH (100  $\mu$ L, 1.75 mmol). The mixture was left to stir for 4h. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography directly with no prior extraction due to the high water solubility of the product. Purification by flash chromatography (C18, gradient 0% to 10% MeCN in Water) gave **II-61** as a colourless oil (540 mg, 66 %).  $^1H$  NMR (500 MHz, MeOD)  $\delta$  7.54 (m, 5H), 4.35 (s, 2H), 3.97 (s, 4H), 3.59 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.19 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 2.82 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.75-1.69 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 0.44 (q, BH3);  $^{13}C$  NMR (127 MHz, MeOD)  $\delta$  130.9, 129.9, 129.2, 110.7, 64.8, 61.8, 59.9, 56.0, 39.0, 33.3, 33.2, 26.8, 18.8; HRMS (ESI) calcd for  $C_{17}H_{28}NO_3$   $[M + H]^+$  294.2064, found 294.2071.

**1-(benzyl(methyl)amino)-7-hydroxyheptan-4-one (II-62)**



To a solution of acetal **II-61** (166 mg, 0.57 mmol) in acetone was added a few drops of HCl. The mixture was left to stir for 10 min. The solvent were removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (C18, gradient 0% to 10% MeCN in Water) gave **II-62** as a colourless oil (140 mg, quant).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $H_2O$  with  $D_2O$  insert)  $\delta$  7.37 (m, 5H), 4.24 and 4.11 (dd,  $J$  = 13.2 Hz,  $J_{AB}$  = 64 Hz, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.03 and 2.92 (dm,  $J_{AB}$  = 61 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.51 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 1.86 and 1.78 (dm,  $J_{AB}$  = 43 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H);  $^{13}C$  NMR (127 MHz,  $H_2O$  with  $D_2O$  insert)  $\delta$  214.6, 131.0, 130.2, 129.4, 129.2, 62.8, 61.1, 59.9, 54.7, 39.6, 38.7, 25.9, 18.0; HRMS (ESI) calcd for  $C_{15}H_{24}NO_2$   $[M + H]^+$  250.1802, found 250.1801.

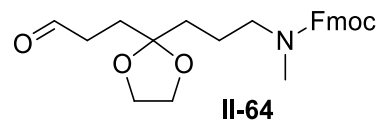
**(9H-fluoren-9-yl)methyl 3-(2-(3-hydroxypropyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propyl(methyl)carbamate (II-63)**



To a solution of **II-38** (1.67 g, 8.25 mmol) in a mixture of water (15 mL) and dioxane (15 mL) was added successively  $K_2CO_3$  (1.25 g, 9.07 mmol) and Fmoc-Cl (2.24 g, 8.66 mmol). The mixture was left to stir at room temperature overnight. The dioxane was removed by evaporation under reduced pressure and the mixture was then extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 30 mL). The combined organic extracts were washed with brine (30 mL), dried over  $Na_2SO_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 1:9 to 1:1, EtOAc: Cyclohexane) gave **II-63** as a colorless oil (2.50 g, 71%).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.81 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.45 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.36 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 4.46 (dd,  $J$  = 5.5

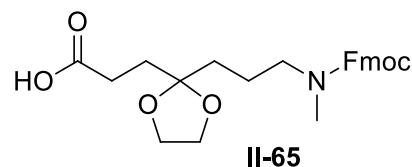
Hz,  $J = 22.7$  Hz, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.00-3.98 (m, 4H), 3.68 (m, 2H), 3.35 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 2.96 (s, 3H), 1.77 (m, 2H), 1.67 (m, 4H), 1.58 (m, 2H).

**(9H-fluoren-9-yl)methyl methyl(3-(2-(3-oxopropyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propyl)carbamate (II-64)**



To a solution of alcohol **II-63** (2.02 g, 4.75 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) was added per portion Dess-Martin Periodinane (3.02 g, 7.13 mmol) at 0 °C. The mixture was left to stir at rt for 1h before the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 mL) and extracted with saturated aq.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  :  $\text{NaHCO}_3$  (1 : 1) solution (30 mL), then washed with water (30 mL) and finally with brine. The organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Silica gel; gradient 0% to 1%, MeOH in  $\text{CHCl}_3$ ) gave **II-64** as a colorless oil (1.90 g, 94 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.76 (s, 1H), 7.81 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.45 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.36 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 4.47 (dd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 32.0$  Hz, 2H), 4.29 (m, 1H), 3.94 (m, 4H), 3.35 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 2.95 (d,  $J = 4.0$  Hz, 3H), 2.49 (m, 2H), 2.08-2.03 (m, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.54 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR 202.1, 156.4, 144.3, 141.5, 127.8, 127.2, 125.2, 125.0, 120.2, 67.4 and 67.3, 65.3, 65.2, 49.2 and 48.8, 47.6, 38.5, 34.8, 34.7 and 34.1, 30.1, 22.6 and 22.2;

**3-(2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)(methyl)amino)propyl)-1,3-dioxolan-2-yl)propanoic acid (II-65)**

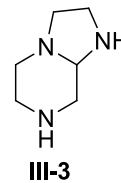


To a solution of alcohol **II-63** (0.507 g, 1.20 mmol), TEMPO (13 mg, 0.08 mmol) in MeCN (6 mL), and phosphate buffer (5 mL of 1:1 mixture of 0.67 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 0.67 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) were added simultaneously a solution of NaOCl (13% w/v, 25  $\mu\text{L}$ , 0.05 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (0.1 mL) and a solution of  $\text{NaClO}_2$  (80%, 271 mg, 2.4 mmol) in  $\text{H}_2\text{O}$  (1 mL) at 35 °C over 2 h. The mixture was left to stir overnight and was then cooled in an ice bath and 2 M NaOH (1.6 mL) plus a solution of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (0.39 g) in  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL) were added. The solution was stirred 5 min on ice and then extracted with MTBE (5 mL). The aqueous layer was acidified to pH = 3 with 1 M HCl and extracted with MTBE (4 x 7 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), and then dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . The solvent was removed under reduced pressure to yield the pure acid **II-65** colorless oil (582 mg, quant).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.61 (m, 2H), 7.42 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 4.45 (dd,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 32.0$  Hz, 2H), 4.26 (m, 1H), 3.97 (m, 4H), 3.32 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 2.91 (d,  $J = 4.0$  Hz, 3H), 2.44 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.49 (m, 2H).

## Procedures for Part III

### Octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine (**III-3**)

A solution of chloroacetaldehyde (45 % in water, 12.4 g, 71 mmol) in 50 mL of acetonitrile was added at 20 °C to a solution of diethylenetriamine (7.33 g, 0.71 mol) and 19.68 g of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.14 mol, 2 equiv.) in acetonitrile (100 mL). The mixture was stirred at this temperature for 6 h. After filtration on celite, the solvent was evaporated. The oily residue was taken up in diethylether (100 mL), insoluble impurities were removed by filtration. After evaporation of the solvent, compound **III-3** was isolated as a yellow oil (m = 1.93 g, yield = 21 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1.60-1.81 (bs, 2H, NH), 1.93-2.04 (m, 2H), 2.23 (m, 1H), 2.43-2.45 (m, 2H), 2.56-2.63 (m, 3H), 2.73-2.77 (m, 2H), 2.87 (dd, 2H).

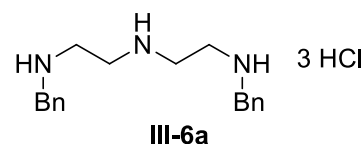


### General procedure A. Selective di-alkylation of diethylenetriamine **III-1** by reductive amination:

Diethylenetriamine (5.0 mL, 46.1 mmol) was added to a solution of aldehyde (2 equiv.) in abs. EtOH (350 mL). The mixture was heated to 50°C for 2 h, cooled down to room temperature. NaBH<sub>4</sub> (8.7 g, 369 mmol) was added carefully and then the mixture was heated back to 50°C for 2h. The solvent was then removed under reduced pressure and the residues were dissolved in a 1M NaOH aqueous solution (250 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 250 mL). The organic phases were combined, washed with a 1M NaOH aqueous solution (250 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

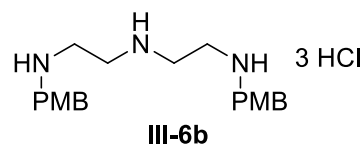
### 1,7-dibenzyl-diethylenetriamine tris hydrochloride (**III-6a**).

The compound was synthesized by following procedure A from benzaldehyde. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution was concentrated to half its volume and treated with conc. HCl (12.5 mL, 37%). The resulting precipitate was filter through a sintered glass funnel and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Ether. **III-6a** was obtained as a colourless powder (17.2 g, 95 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.44 (m, 10H), 4.26 (s, 4H), 3.38 (s, 8H). MS (ESI) C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 284.2.



### 1,7-bis(4-methoxybenzyl)-diethylenetriamine tris hydrochloride (**III-6b**).

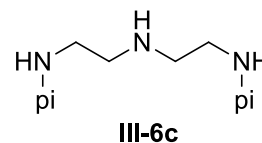
The compound was synthesized by following procedure A from *p*-anisaldehyde. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution was concentrated to half its volume and treated with conc. HCl (12.5 mL, 37%). The resulting precipitate was filter through a sintered glass funnel and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Ether. **III-6b** was obtained as a colourless powder (19.8 g, 96 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300



MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.34 (d, 4H), 6.97 (d, 4H), 4.16 (s, 4H), 3.75 (s, 6H), 3.39 (s, 8H). MS (ESI) C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 344.2

### 1,7-bis(pyridin-2-ylmethyl)-diethylenetriamine (**III-6c**).

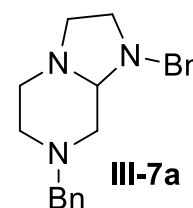
The compound was synthesized by following procedure A from 2-pyridinecarboxaldehyde. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to give **III-6c** as a reddish oil (11.4 g, 92 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.52 (d, 1H), 8.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.49 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.11 (m, 2H), 3.98 (d, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.61 (d, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.99-2.87 (m, 3H), 2.75 (d, 1H), 2.53-2.41 (m, 4H), 2.13 (t, 1H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.6, 158.3, 149.2, 148.7, 136.4 (d), 123.2, 122.7, 122.0, 121.9, 81.3, 64.3, 56.7, 52.0, 51.4, 50.4, 50.0. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 310.2026; found 310.2012.



**General procedure B. Formation of the 1,7-bis-alkylated-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine:** A solution of chloroacetaldehyde (1 equiv., 45% w/w in water) in MeCN (5 mL per mmol) was added dropwise onto a solution of 1,7-bis-alkylated diethylenetriamine (1 equiv.) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 equiv.) in MeCN (5 mL per mmol) under vigorous stirring. The reaction was left to stir for 4 h before removing the salt by filtration over a celite pad. The solvent is then removed under reduced pressure and the residue is dissolved in a minimum of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> solution is added dropwise into a big volume of Ether (20 mL per mmol). The mixture is filtered through a sintered glass funnel and the filtrate is concentrated under reduced pressure to give the desired product. Repeat purification on the recovered solid/oily phase if necessary.

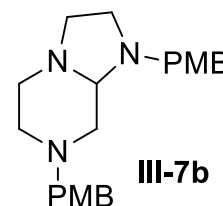
### 1,7-dibenzyl-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine (**III-7a**).

The compound was synthesized by following procedure B from reactant **III-6a** in its neutral form (822 mg, 2.90 mmol). **III-7a** was obtained as yellowish oil (810 mg, 91 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.46 (m, 10H), 4.02 (d, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.63 (d, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.99-2.87 (m, 3H), 2.75 (d, 1H), 2.53-2.41 (m, 4H), 2.13 (t, 1H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  163.3, 139.3, 138.1, 129.2, 128.5, 128.2, 128.2, 127.0, 126.9, 81.5, 65.9, 62.9, 57.8, 56.7, 51.9, 51.2. HRMS (ESI): calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 308.2121; found 308.2108.



### 1,7-bis(4-methoxybenzyl)-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine (**III-7b**).

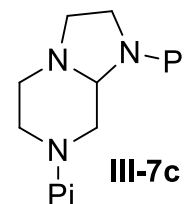
The compound was synthesized by following procedure B from reactant **III-6b** in its neutral form (3.92 g, 11.4 mmol). **III-7b** was obtained as yellowish oil (3.49 g, 93 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.23 (m, 4H), 6.84 (dt, 4H), 3.82 (m, 7H), 3.52 (s, 2H), 3.37 (d, 1H), 3.15 (m, 2H), 2.98 (dt, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.80 (dd, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.50-2.37 (m, 3H), 2.31 (td, 1H), 2.00 (td, 1H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158.7, 158.6,



131.4, 130.3, 130.1, 129.6, 113.6, 113.5, 81.5, 62.2, 57.1, 56.6, 55.2 (d), 51.9, 51.1, 50.2, 50.1. HRMS (ESI) calcd. for  $C_{22}H_{30}N_5O_2$   $[M + H]^+$  368.2333; found 368.2325.

**1,7-bis(pyridin-2-ylmethyl)octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine (III-7c).**

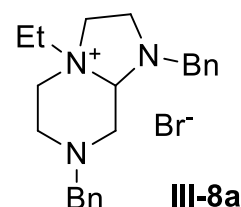
The compound was synthesized by following procedure B from reactant **III-6c** (11.4 g, 40.0 mmol). **III-7c** was obtained as yellowish oil (10.31 g, 84 % yield).  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.52 (d, 1H), 8.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.49 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.11 (m, 2H), 3.98 (d, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.61 (d, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 2.99-2.87 (m, 3H), 2.75 (d, 1H), 2.53-2.41 (m, 4H), 2.13 (t, 1H).  $^{13}C$  NMR (76 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  159.6, 158.3, 149.2, 148.7, 136.4 (d), 123.2, 122.7, 122.0, 121.9, 81.3, 64.3, 56.7, 52.0, 51.4, 50.4, 50.0. HRMS (ESI) calcd. for  $C_{18}H_{24}N_5$   $[M + H]^+$  310.2026; found 310.2012.



**General procedure C. Formation of the 4-alkylated 1,7-bis-alkylated-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium halide:** Alkylating agent (1 equiv.) is added to a solution of 1,7-bis-alkylated-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazine (1 equiv.) and  $K_2CO_3$  (2 equiv.) in MeCN (5 mL per mmol) under vigorous agitation. The reaction is left to stir for 18 h before removing the salt by filtration over a celite pad. The solvent is then removed under reduced pressure and the residue is dissolved in a minimum of  $CH_2Cl_2$ . The  $CH_2Cl_2$  solution is added dropwise into a big volume of Ether (20 mL per mmol). The resulting precipitate is filtered through a sintered glass funnel and washed with Ether. Repeat purification on the recovered solid/oily phase if necessary.

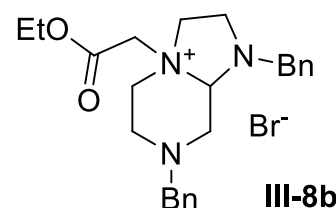
**4-ethyl-1,7-dibenzyl-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium bromide (III-8a).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7a** (305 mg, 1.0 mmol) and ethyl bromide. **III-8a** was obtained as yellowish oil (120 mg, 29 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{22}H_{30}N_3$   $[M]^+$  336.2434; found 336.2432.



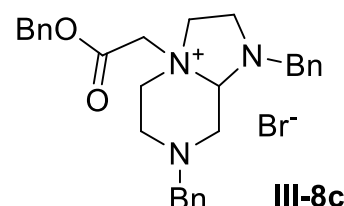
**4-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1,7-dibenzyl-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium bromide (III-8b).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7a** (308 mg, 1.0 mmol) and ethyl bromoacetate. **III-8b** was obtained as yellowish oil (219 mg, 46 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{24}H_{32}N_3O_2$   $[M]^+$  394.2489; found 394.2499.



**4-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-1,7-dibenzyl-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium bromide (III-8c).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7a** (310 mg, 1.0 mmol) and benzyl bromoacetate. **III-8c** was obtained

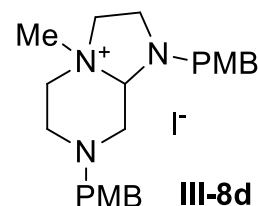




as yellowish oil (278 mg, 52 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{29}H_{34}N_3O_2$   $[M]^+$  456.2646; found 456.2634.

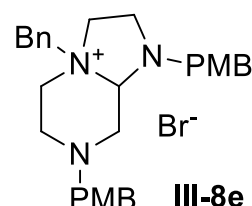
**4-methyl-1,7-bis(4-methoxybenzyl)octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium iodide (III-8d).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7b** (1.29 g, 3.52 mmol) and methyl iodide. **III-8d** was obtained as yellowish oil (1.39 g, 78 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{23}H_{32}N_3O_2$   $[M]^+$  382.2489; found 382.2475.



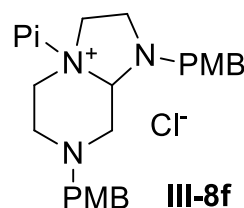
**4-benzyl-1,7-bis(4-methoxybenzyl)octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium bromide (III-8e).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7b** (1.09 g, 6.0 mmol) and benzyl bromide. **III-8e** was obtained as yellowish oil (718 mg, 45 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{29}H_{36}N_3O_2$   $[M]^+$  458.2802; found 458.2813.



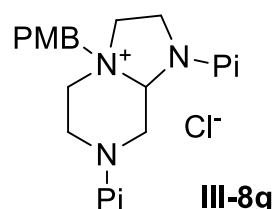
**4-(pyridin-2-ylmethyl)-1,7-bis(4-methoxybenzyl) octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium chloride (III-8f).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7b** (1.08 g, 2.95 mmol) and 2-(chloromethyl)pyridine. **III-8f** was obtained as yellowish oil (788 mg, 54 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{28}H_{35}N_4O_2$   $[M]^+$  459.2755; found 459.2726.



**4-(4-methoxybenzyl)-1,7-bis(pyridin-2-ylmethyl) octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium chloride (III-8g).**

The compound was synthesized by following procedure C from reactant **III-7c** (5.0 g, 16.2 mmol) and 4-methoxybenzyl chloride. **III-8g** was obtained as yellowish oil (3.44 g, 46 % yield). HRMS (ESI) calcd. for  $C_{26}H_{32}N_5O$   $[M]^+$  430.2601; found 430.2582.

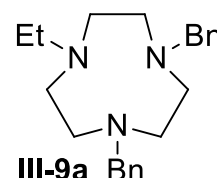


**General procedure D. Macrocycle opening using  $NaBH_4$ :**  $NaBH_4$  (2 equiv.) is added in small portion to a solution of 4-alkylated 1,7-bis-alkylated-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium halide (1 equiv.) in abs. EtOH (10 mL per mmol) at rt. The reaction is left to stir for 10-15 min, monitored by MS, before removing the solvent under reduced pressure. The residues were dissolved in a 1 M NaOH aqueous solution (10 mL per mmol) and extracted with  $CH_2Cl_2$  (3 x 10 mL per mmol). The organic phases were combined, washed with a 1 M NaOH aqueous solution (10 mL per mmol) and dried over  $Na_2SO_4$ .

**General procedure E. Macrocycle opening using NaBH(OAc)<sub>3</sub>:** NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2 equiv.) is added in small portion to a solution of 4-alkylated 1,7-bis-alkylated-octahydroimidazo[1,2-a]pyrazin-4-ium halide (1 equiv.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL per mmol) at rt. The reaction is left to stir for 10-15 min, monitored by MS. The reaction mixture is quenched with in a 1M NaOH aqueous solution (10 mL per mmol) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL per mmol). The organic phases were combined, washed with a 1M NaOH aqueous solution (10 mL per mmol) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

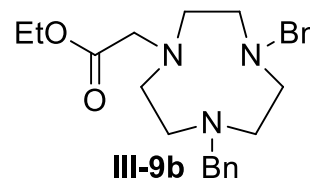
**4-ethyl-1,7-dibenzyl-1,4,7-triazacyclononane (III-9a).**

The compound was synthesized by following procedure D from reactant **III-8a** (120 mg, 0.3 mmol). **III-9a** was obtained as yellowish oil (88 mg, 90 % yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45-7.25 (m, 10H), 3.68 (s, 4H), 2.90 (m, 8H), 2.75 (s, 4H), 2.59 (q, 2H), 1.08 (t, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140.4, 129.1, 128.1, 126.8, 63.2, 55.3, 54.3, 53.4, 51.7, 13.0. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 338.2591; found 338.2598.



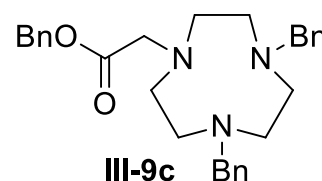
**4-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1,7-dibenzyl-1,4,7-triazacyclononane (III-9b).**

The compound was synthesized by following procedure E from reactant **III-8b** (220 mg, 0.46 mmol). **III-9b** was obtained as yellowish oil (177 mg, 97 % yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45-7.20 (m, 10H), 4.19 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.69 (s, 4H), 3.44 (s, 2H), 2.98 (m, 4H), 2.91 (m, 4H), 2.81 (s, 4H), 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.2, 139.9, 129.2, 128.2, 126.9, 62.8, 60.3, 59.2, 55.4, 55.3, 54.9, 14.4. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 396.2646; found 396.2666.



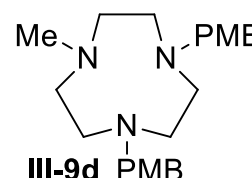
**4-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-1,7-dibenzyl-1,4,7-triazacyclononane (III-9c).**

The compound was synthesized by following procedure E from reactant **III-8c** (280 mg, 0.52 mmol). **III-9c** was obtained as yellowish oil (228 mg, 96 % yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45-7.20 (m, 15H), 5.18 (s, 2H), 3.68 (s, 4H), 3.50 (s, 2H), 2.99 (m, 4H), 2.89 (m, 4H), 2.79 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 172.0, 140.1, 135.9, 129.1, 128.6, 128.3, 128.2, 127.0, 126.8, 66.1, 62.9, 59.1, 55.5, 55.3, 55.1. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 458.2802; found 458.2812.



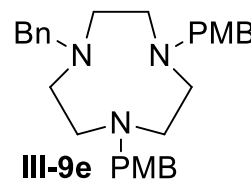
**4-methyl-1,7-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane (III-9d).**

The compound was synthesized by following procedure D from reactant **III-8d** (1.39 g, 2.73 mmol). **III-9d** was obtained as yellowish oil (336 mg, 32 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.19 (d, 4H), 6.84 (d, 4H), 3.77 (s, 6H), 3.68 (s, 4H), 3.23 (m, 4H), 2.96 (m, 4H), 2.68 (m, 4H), 2.42 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.3, 130.6, 129.5, 114.0, 61.3, 55.3, 53.4, 52.9, 50.3, 42.5. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 384.2646; found 384.2638.

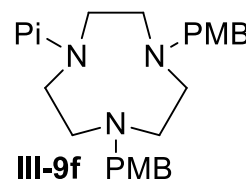


**4-benzyl-1,7-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane (III-9e).**

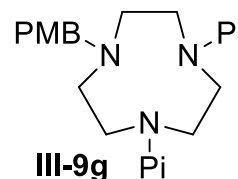
The compound was synthesized by following procedure D from reactant **III-8e** (718 mg, 1.33 mmol). **III-9e** was obtained as yellowish oil (321 mg, 52 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O of 3 HCl salt of **6e**) δ 7.45-7.28 (m, 9H), 6.91 (d, 4H), 4.71 (s, 3H, NH), 4.08 (s, 4H), 4.01 (s, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.14 (br, 12H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 159.9, 132.5, 131.1, 130.7, 129.7, 129.2, 122.6, 114.6, 66.0, 60.7, 55.4, 49.4, 49.1, 49.0. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 460.2959; found 460.2946.

**4-(pyridin-2-ylmethyl)-1,7-bis(4-methoxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane (III-9f).**

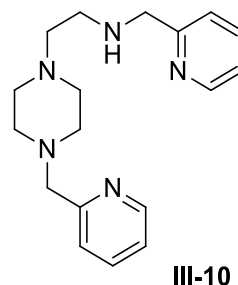
The compound was synthesized by following procedure D from reactant **III-8f** (450 mg, 0.90 mmol). **III-9f** was obtained as yellowish oil (328 mg, 76 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.54 (d, 1H), 7.62 (t, 4H), 7.50 (d, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.15 (t, 4H), 6.81 (d, 4H), 3.85 (s, 6H), 3.85 (s, 2H), 3.52 (s, 4H), 2.93 (s, 4H), 2.84 (m, 4H), 2.72 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.2, 158.4, 148.9, 136.2, 132.3, 130.1, 123.2, 121.7, 113.7, 64.7, 62.6, 55.7, 52.3, 52.1, 51.9. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup> 461.2911; found 461.2935.

**4-(4-methoxybenzyl)-1,7-bis(pyridin-2-ylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane (III-9g).**

The compound was synthesized by following procedure D from reactant **III-8g** (2.54 g, 5.45 mmol). **III-9g** was obtained as yellowish oil (1.78 g, 76 % yield). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.52 (d, 2H), 7.65 (t, 2H), 7.52 (d, 2H), 7.25 (d, 2H), 7.14 (t, 2H), 6.84 (d, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 4H), 3.56 (s, 2H), 2.93 (s, 4H), 2.87 (m, 4H), 2.78 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.7, 158.4, 148.9, 136.2, 132.3, 130.1, 123.2, 121.7, 113.7, 64.7, 62.6, 55.7 (d), 55.6, 55.2. HRMS (ESI) calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O [M + H]<sup>+</sup> 432.2756; found 432.2739.

**N-(pyridin-2-ylmethyl)-2-(4-(pyridin-2-ylmethyl)piperazin-1-yl)ethanamine (III-10)**

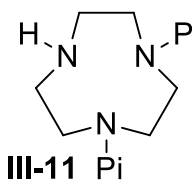
To a solution of **III-7c** (1.0 g, 3.2 mmol) in EtOH (30 mL) is added NaBH<sub>4</sub> (610 mg, 16.2 mmol) in small portion. The solution is left to stir for 10-15 min, monitored by MS, before removing the solvent under reduced pressure. The residues were dissolved in a 1M NaOH aqueous solution (30 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). The organic phases were combined, washed with a 1M NaOH aqueous solution (30 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure to yield **III-10** as a yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.56 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.40 (d, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.17 (m, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 2.82 (t, 2H), 2.62-2.50 (m, 10H). <sup>13</sup>C NMR (76 MHz,



$\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.5, 158.2, 149.3 (d), 136.7, 136.3, 123.2, 122.4, 122.3, 122.0, 64.6, 57.1, 54.4, 53.2, 53.1, 45.7;

### 1,4-bis(pyridin-2-ylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane (**III-11**).

2-chloroethyl-chloroformate (0.25 mL, 2.5 mmol) is added to a solution of **III-9g** (1.0 g, 2.3 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (640 mg, 4.6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). The reaction is left to stir for 2-3 h, monitored by MS, before filtering over a celite pad and then removing the solvent under reduced pressure. The residue was dissolved in MeOH (20 mL) and heated to reflux for 15 min. The solvent is then removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography (Basic alumina, gradient from 0 to 10 % MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). **III-11** was isolated as an orange oil (265 mg, 37 %).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.66 (d, 2H), 7.59 (t, 2H), 7.22 (m, 4H), 3.93 (s, 4H), 3.21 (m, 4H), 3.01 (t, 4H), 2.75 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (76 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  158.2, 149.6, 136.8, 122.8, 122.6, 60.9, 53.1, 49.7, 45.5.



## Biological Methods

### 1. Test FRET :

HIV PR was purchased from BioVendor, and HIV PR substrate 1 (DABCYL-GABA-Ser-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS) was obtained from TebuBio. Enzymatic activity and inhibition were determined by a fluorogenic assay using a microplate spectrofluorimeter (Spectramax Gemini XS, Molecular Devices) and black 384-well plates (NUNCLONE, Nunc Inc.). Hydrolysis of the fluorogenic substrate was investigated at pH 4.7, 37 °C in 0.1 M acetate, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 1 mg/mL bovine serum albumin. The entire time course was recorded by monitoring the fluorescence at 490 nm with an excitation wavelength set to 340 nm. Each initial rate was the average value of five independently performed reactions.  $K_M$  determination was performed using a range of fluorogenic substrate concentrations from 20 to 80  $\mu\text{M}$  and an HIV PR concentration of 12.3 nM. Final solutions contained 10% DMSO. For determination of  $\text{IC}_{50}$  and  $K_i$  values, inhibitors were preincubated with HIV PR for 30 min.  $\text{IC}_{50}$  determinations were performed using 10% DMSO solutions containing a final of 12.3 nM HIV PR and 4  $\mu\text{M}$  fluorogenic substrate. Initial rates were determined for at least five inhibitor concentrations.  $K_i$  determinations were performed using 10% DMSO solutions containing a final of 12.3 nM HIV PR. Initial rates were determined for at least five inhibitor concentrations and four fluorogenic substrate concentrations (2, 3, 4, and 5  $\mu\text{M}$ ).

## 2. ABC pumps transport inhibition

It is known that the acquired resistance to mitoxantrone is due to the enhanced drug efflux via P-gp or BCRP over-expression. Mitoxantrone efflux mediated by P-gp and BCRP is recorded by flow cytometry in the presence or absence of compounds and 2 known inhibitors of both pumps, GF120918 (elacridar) and Ko123.

Fifty thousand cells, either control (NIH3T3) or expressing Pgp (NIH3T3 MDR G185), and one hundred thousand cells, either control (pcDNA3) or expressing BCRP (BCRP) were incubated for 24 hours in growth medium and then one hour at 37°C in DMEM with 5 µM mitoxantrone in the presence of 2 µM or 10 µM of each compound of the present study. Cells were washed with PBS, trypsinised, and the mitoxantrone intracellular accumulation was quantified by fluorescence coupled to flow cytometry carried out on a FACS Calibur cytometer (Becton Dickinson), exciting at 488 nm and emitting at 650 nm. Data was collected on CellQuest Pro (version 4.0) software and then exported to FlowJo for analysis. Mitoxantrone (Sigma Aldrich) was dissolved in 100 % DMSO at 20 mM stock concentration and stored at – 20 °C.

Table 1 shows that compounds do not inhibit the efflux of mitoxantrone compared with GF120918 or Ko123.

Table 1. Inhibition of mitoxantrone efflux by P-glycoprotein or BCRP. Data are the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments.				
Compound	Inhibition of P-gp (%)		Inhibition of BCRP (%)	
	At 2 µM	At 10 µM	At 2 µM	At 10 µM
<b>I-37</b>	2.3 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.03	8.1 $\pm$ 0.3
<b>W</b>	5.5 $\pm$ 0.5	6.4 $\pm$ 0.7	0.2 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.01
<b>I-34</b>	7.1 $\pm$ 0.3	11.5 $\pm$ 1.2	0.2 $\pm$ 0.02	3.3 $\pm$ 1.7
<b>I-20</b>	1.1 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.9

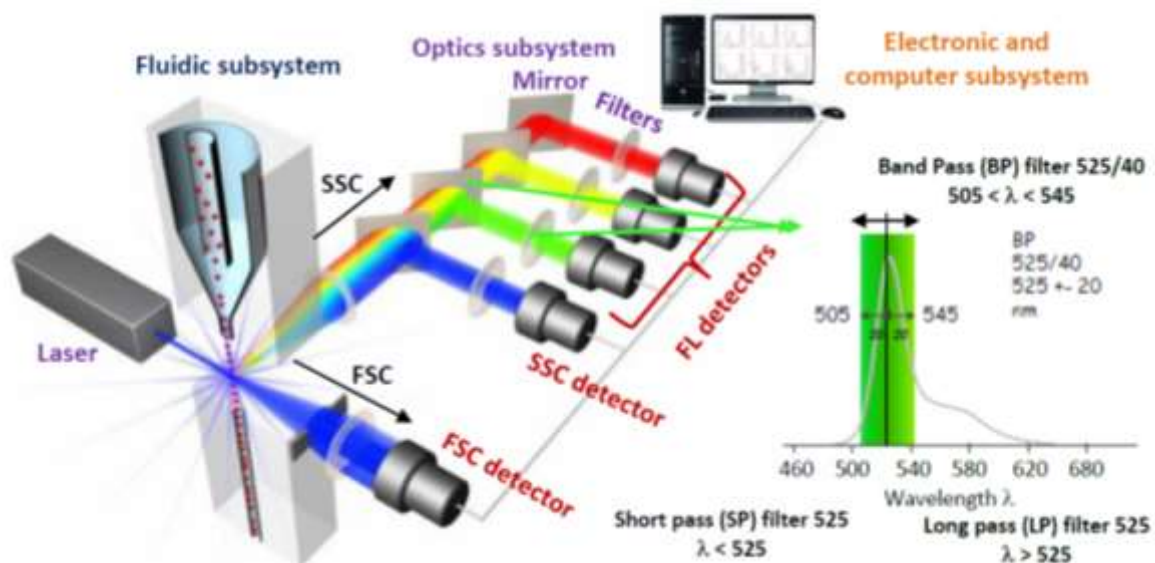
<b>I-54</b>	4.6±0.2	4.8±0.1	2.5±0.6	8.4±1.1
<b>I-53</b>	7.7±0.1	22.7±0.5	0.9±0.5	8.1±0.3
<b>I-52</b>	1.8±0.2	15±2.0	1.8±0.2	8.8±1.1
<b>GF120918</b>	110±2.5			
<b>Ko143</b>			100±1.5	

## Annexes

### Cytométrie de Flux

La cytométrie de flux est une technique très puissante pour mesurer différentes caractéristiques de cellules ou particules entrainées dans un flux gazeux ou liquide passant à grande vitesse dans un capillaire grâce à un laser. A l'aide d'une vitesse élevée (de l'ordre de 10 m/s) et de l'étranglement hydraulique, les cellules (d'une taille généralement comprise entre 0.2 et 50  $\mu\text{m}$ ) passent alors devant le laser une par une et diffusent, réfractent et/ou émettent un signal fluorescent. On peut ainsi compter les cellules et les trier grâce à trois paramètres :

- La diffusion aux petits angles ou diffusion dans l'axe de propagation laser (FSC pour *forward scatter*) qui donne une information sur la taille de la cellule.
- La diffusion orthogonale (SSC pour *side scatter*) qui donne une information sur la granularité et la complexité structurale de la cellule.
- L'émission de fluorescence (FL pour *fluorescent light*)



Un cytomètre de flux est composé de plusieurs sous-système permettant la récolte des trois paramètres cités précédemment (Figure A.1.):

- Un sous-système fluidique qui permet le transport de l'échantillon devant le laser (Fluidic subsystem).

- Un sous-système optique comprenant le Laser, le détecteur de FSC, une série de miroirs dichroïque et de filtres pour sélectionner différentes longueurs d'onde et détecter la SSC (Optics subsystem).
- Un sous système électronique et d'analyse de données (Electronic and computer subsystem).

On peut donc avoir une représentation graphique en fonction de la taille des cellules et de leur granularité et rajouter un troisième paramètre (fluorescence, nombre de cellules...). On peut également choisir les populations d'intérêts (Figure A.2.)

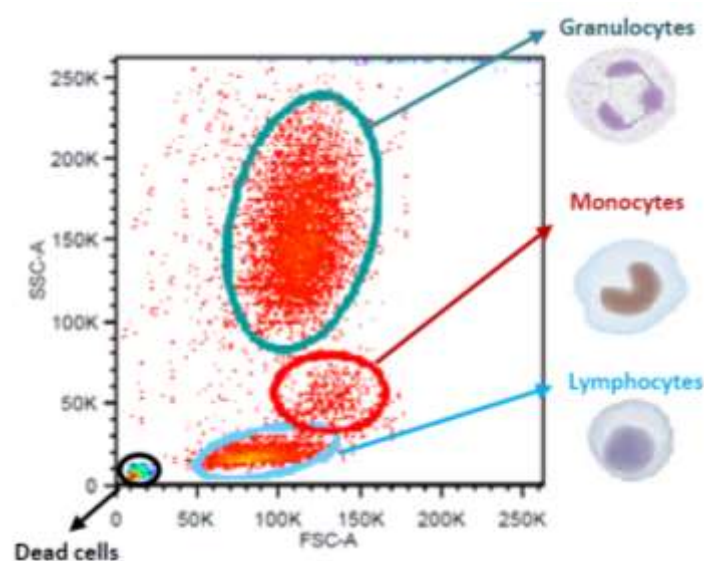


Figure A.2. Histogramme biparamétrique permettant de choisir les cellules d'intérêts.

On peut alors choisir une zone d'intérêt et représenter le nombre de cellules en fonctions de la fluorescence par exemple (Figure A.3.).

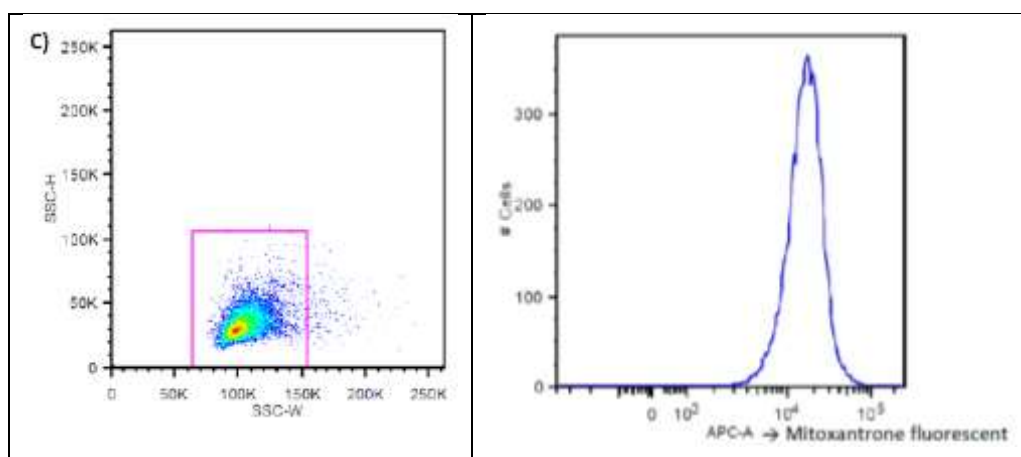
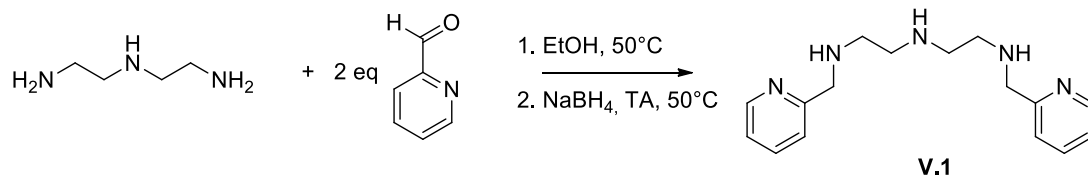


Figure A.3. Sélection d'une zone d'intérêt et représentation de la population choisie en nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence de la mitoxantrone.

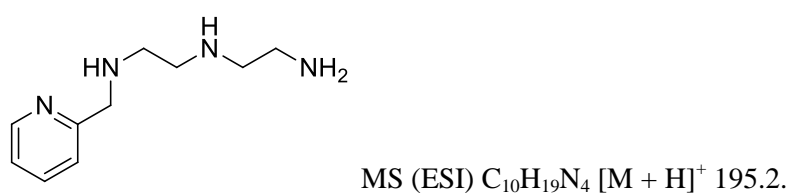


## Etude d'impuretés et d'intermédiaires réactionnels

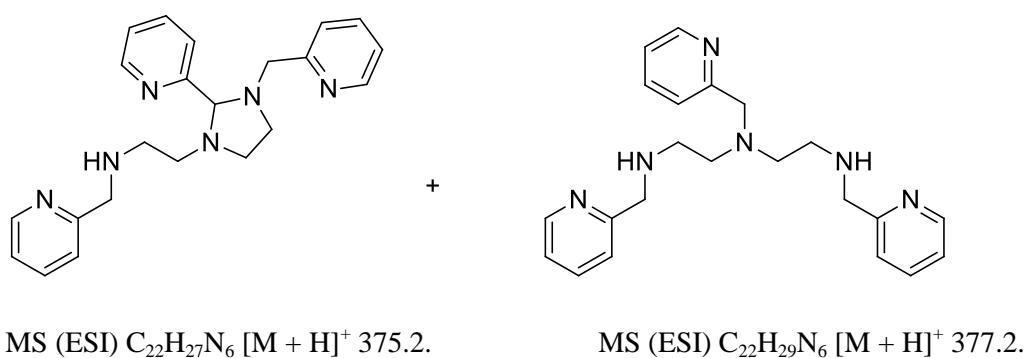
### Etape 1 :



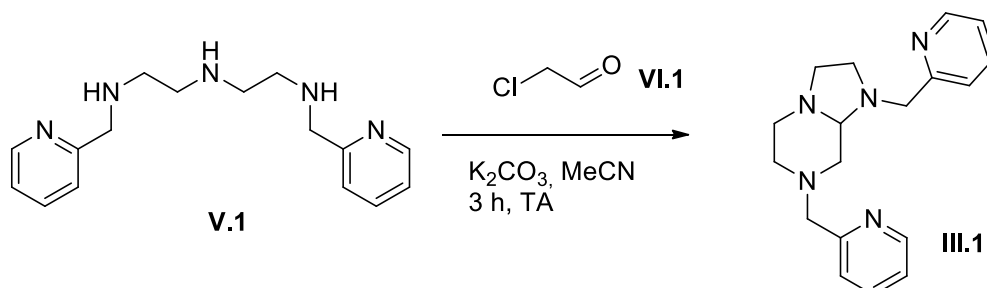
Si l'aldéhyde est mis en défaut, on observera la formation de :



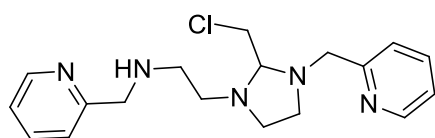
Si l'aldéhyde est ajouté en excès, on observera la formation de :



### Etape 2 :

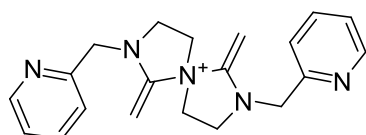


On observe l'intermédiaire réactionnel suivant :



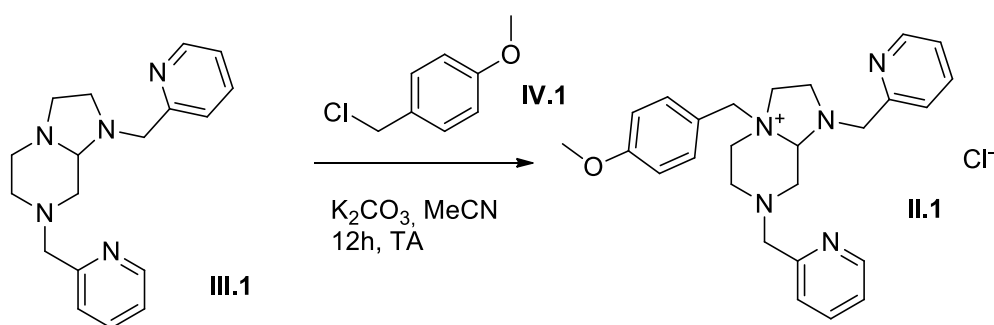
MS (ESI)  $C_{18}H_{25}ClN_5$   $[M + H]^+$  346.2.

Si le chlorure d'acétaldéhyde est additionné trop rapidement ou/et en excès, on observera la formation de :

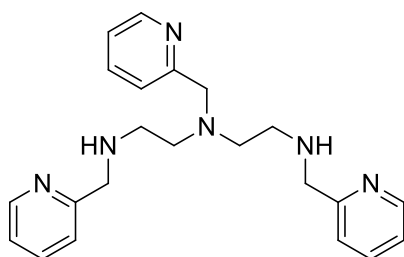


MS (ESI)  $C_{20}H_{24}N_5$   $[M]^+$  334.2.

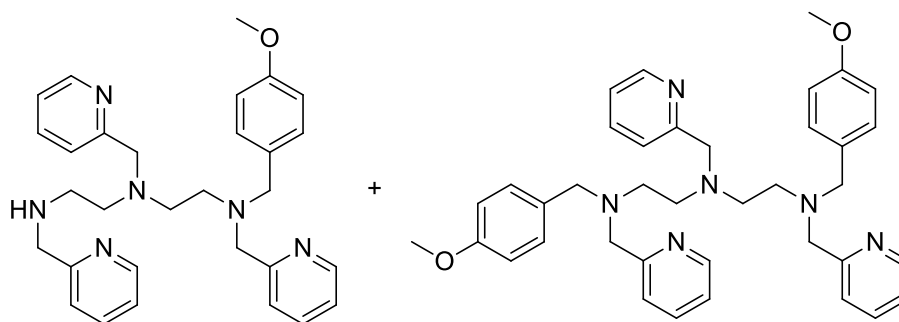
### Etape 3 :



Dans le cas de présence d'impuretés des étapes précédentes comme par exemple :



On observera la formation de :



MS (ESI)  $C_{30}H_{36}N_6O$   $[M + H]^+$  497.3.

MS (ESI)  $C_{38}H_{45}N_6O_2$   $[M + H]^+$  617.4.

## Bibliographie

- (1) Hogg, R. S.; Althoff, K. N.; Samji, H.; Cescon, A.; Modur, S.; Buchacz, K.; Cohen, M.; Gebo, K. A.; Gill, M. J.; Justice, A.; Kirk, G.; Klein, M. B.; Korthuis, P. T.; Martin, J.; Napravnik, S.; Rourke, S. B.; Sterling, T. R.; Silverberg, M. J.; Deeks, S.; Jacobson, L. P.; Bosch, R. J.; Kitahata, M. M.; Goedert, J. J.; Moore, R.; Gange, S. J. In *7th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention* Kuala Lumpur, 2013.
- (2) Pauling, L. *Chemical & Engineering News Archive* **1946**, 24, 1375.
- (3) Jencks, W. P. *Current aspects of biochemical energetics* **1966**, 273.
- (4) Tyndall, J. D. A.; Nall, T.; Fairlie, D. P. *Chemical Reviews* **2005**, 105, 973.
- (5) Brik, A.; Wong, C.-H. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 5.
- (6) Gautier, A.; Pitrat, D.; Hasserodt, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 3835.
- (7) Waibel, M.; Pitrat, D.; Hasserodt, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, 3671.
- (8) Gellman, S. H. *Accounts of Chemical Research* **1998**, 31, 173.
- (9) Seebach, D.; Ciceri, P. E.; Overhand, M.; Jaun, B.; Rigo, D.; Oberer, L.; Hommel, U.; Amstutz, R.; Widmer, H. *Helvetica Chimica Acta* **1996**, 79, 2043.
- (10) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chemical Reviews* **2001**, 101, 3219.
- (11) Hanessian, S.; Luo, X.; Schaum, R.; Michnick, S. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 8569.
- (12) Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89, 9367.
- (13) Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Huang, K.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 6778.
- (14) Wu, C. W.; Sanborn, T. J.; Zuckermann, R. N.; Barron, A. E. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, 2958.
- (15) Zych, A. J.; Iverson, B. L. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 8898.
- (16) Hamuro, Y.; Geib, S. J.; Hamilton, A. D. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 7529.
- (17) Berl, V.; Krische, M. J.; Huc, I.; Lehn, J.-M.; Schmutz, M. *Chemistry – A European Journal* **2000**, 6, 1938.
- (18) Stone, M. T.; Moore, J. S. *Organic Letters* **2004**, 6, 469.
- (19) Horne, W. S. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2011**, 6, 1247.
- (20) Leonard, N. *Record of Chemical Progress* **1956**, 17, 243.
- (21) Pilmé, J.; Berthoumieux, H.; Robert, V.; Fleurat-Lessard, P. *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13, 5388.
- (22) Rademacher, P. *Chemical Society Reviews* **1995**, 24, 143.
- (23) Bell, M. R.; Archer, S. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, 151.
- (24) Bürgi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E. *nature new biology* **1973**, 244, 186.
- (25) Kermack, W. O.; Robinson, R. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1922**, 121, 427.
- (26) Huisgen, R.; Wieland, H.; Eder, H. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1949**, 561, 193.
- (27) Wunderlich, J. A. *Acta Crystallographica* **1967**, 23, 181.

- (28) Hall, S. R. *Acta Crystallographica Section B* **1968**, 24, 337.
- (29) Hall, S. R.; Ahmed, F. R. *Acta Crystallographica Section B* **1968**, 24, 346.
- (30) Birnbaum, K. B.; Klasek, A.; Sedmera, P.; Snatzke, G.; Johnson, L. F.; Santavy, F. *Tetrahedron Letters* **1971**, 12, 3421.
- (31) Birnbaum, G. I. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96, 6165.
- (32) Kogure, N.; Nishiya, C.; Kitajima, M.; Takayama, H. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, 5857.
- (33) Chang, Y.-C.; Hsieh, P.-W.; Chang, F.-R.; Wu, R.-R.; Liaw, C.-C.; Lee, K.-H.; Wu, Y.-C. *Planta Med* **2003**, 69, 148.
- (34) Sisko, J.; Weinreb, S. M. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, 3210.
- (35) Denhart, D. J.; Griffith, D. A.; Heathcock, C. H. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 9616.
- (36) Downham, R.; Ng, F. W.; Overman, L. E. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, 8096.
- (37) Hourcade, S.; Ferdenzi, A.; Retailleau, P.; Mons, S.; Marazano, C. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 2005, 1302.
- (38) Hong, S.; Yang, J.; Weinreb, S. M. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 2078.
- (39) Leonard, N. J.; Fox, R. C.; Oki, M. *Journal of the American Chemical Society* **1954**, 76, 5708.
- (40) Kirby, A. J.; Komarov, I. V.; Bilenko, V. A.; Davies, J. E.; Rawson, J. M. *Chemical Communications* **2002**, 2106.
- (41) Leonard, N. J.; Oki, M.; Chiavarelli, S. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, 6234.
- (42) Leonard, N. J.; Oki, M.; Chiavarelli, S. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, 6237.
- (43) Leonard, N. J.; Adamcik, J. A.; Djerassi, C.; Halpern, O. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, 80, 4858.
- (44) McCrindle, R.; McAlees, A. J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1983**, 61.
- (45) Leonard, N. J.; Oki, M. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, 6241.
- (46) Leonard, N. J.; Oki, M. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, 6245.
- (47) Carroll, J. D.; Jones, P. R.; Ball, R. G. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, 4208.
- (48) Dahn, H.; Schlunke, H. P.; Temler, J. *Helvetica Chimica Acta* **1972**, 55, 907.
- (49) Spanka, G.; Rademacher, P. *The Journal of Organic Chemistry* **1986**, 51, 592.
- (50) Davies, J. E.; Kirby, A. J.; Komarov, I. V. *Helvetica Chimica Acta* **2003**, 86, 1222.
- (51) Burgi, H. B.; Dunitz, J. D.; Shefter, E. *Journal of the American Chemical Society* **1973**, 95, 5065.
- (52) Burgi, H. B.; Dunitz, J. D. *Accounts of Chemical Research* **1983**, 16, 153.
- (53) Radzicka, A.; Wolfenden, R. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 6105.
- (54) Babine, R. E.; Bender, S. L. *Chemical Reviews* **1997**, 97, 1359.
- (55) Schechter, I.; Berger, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, 27, 157.
- (56) Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Medicinal Chemistry* **2005**, 1, 71.
- (57) Clercq, E. D. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, 6, 1001.

- (58) Rawling, N. D.; Barret, A. J. *Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism.*; Barret, A.J., Ed ; Academic Press, 1995; Vol. 248.
- (59) Tong, L. *Chemical Reviews* **2002**, 102, 4609.
- (60) Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A.; Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, 30, 8454.
- (61) Boggetto, N.; Reboud-Ravaux, M. *Virologie* **2001**, 5, 9.
- (62) Okimoto, N.; Tsukui, T.; Hata, M.; Hoshino, T.; Tsuda, M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, 7349.
- (63) Piana, S.; Bucher, D.; Carloni, P.; Rothlisberger, U. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 11139.
- (64) Allen, F. H.; Kennard, O.; Watson, D. G.; Brammer, L.; Orpen, A. G.; Taylor, R. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1987**, S1.
- (65) Venturini, A.; López-Ortiz, F.; Alvarez, J. M.; González, J. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 1110.
- (66) de Oliveira, T.; Engelbrecht, S.; Janse van Rensburg, E.; Gordon, M.; Bishop, K.; zur Megede, J. B., S.W.; Cassol, S. *Journal of Virology* **2003**, 77, 9422.
- (67) Erickson, J. W.; Eissanstat, M. A. *HIV Proteinase as a Target for the Design of Antiviral Agents for AIDS.*; Dunn, B.M. Ed.; Academic Press: San Diego, 1999.
- (68) Huff, J. R. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, 34, 2305.
- (69) Pear, L. H.; Taylo, W. R. *Nature new biology* **1987**, 328, 482.
- (70) Yaron, A.; Naider, F. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1993**, 28, 31.
- (71) Maly, D. J.; Huang, L.; Ellman, J. A. *ChemBioChem* **2002**, 3, 16.
- (72) Bajorath, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 882.
- (73) Rich, D. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **1985**, 28, 263.
- (74) Ghosh, A. K.; Chapsal, B. D.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. *Accounts of Chemical Research* **2007**, 41, 78.
- (75) Tantillo, D. J.; Houk, K. N. *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 3066.
- (76) Bursavich, M. G.; Rich, D. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 541.
- (77) Hamilton, H. W.; Steinbaugh, B. A.; Stewart, B. H.; Chan, O. H.; Schmid, H. L.; Schroeder, R.; Ryan, M. J.; Keiser, J.; Taylor, M. D. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 1446.
- (78) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 23, 3.
- (79) Loughlin, W. A.; Tyndall, J. D. A.; Glenn, M. P.; Fairlie, D. P. *Chemical Reviews* **2004**, 104, 6085.
- (80) Lam, P.; Jadhav, P.; Eyermann, C.; Hodge, C.; Ru, Y.; Bacheler, L.; Meek, J.; Otto, M.; Rayner, M.; Wong, Y.; et, a. *Science* **1994**, 263, 380.
- (81) Lam, P. Y. S.; Ru, Y.; Jadhav, P. K.; Aldrich, P. E.; DeLucca, G. V.; Eyermann, C. J.; Chang, C.-H.; Emmett, G.; Holler, E. R.; Daneker, W. F.; Li, L.; Confalone, P. N.; McHugh, R. J.; Han, Q.; Li, R.; Markwalder, J. A.; Seitz, S. P.; Sharpe, T. R.; Bacheler, L. T.; Rayner, M. M.; Klabe, R. M.; Shum, L.; Winslow, D. L.; Kornhauser, D. M.; Jackson, D. A.; Erickson-Viitanen, S.; Hodge, C. N. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39, 3514.
- (82) Smithrud, D. B.; Benkovic, S. J. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, 8, 459.
- (83) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 305.
- (84) Hollfelder, F.; Kirby, A. J.; Tawfik, D. S.; Kikuchi, K.; Hilvert, D. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 1022.

- (85) Barbany, M.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sanz, F.; Villà-Freixa, J.; Warshel, A. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 277.
- (86) Gautier, A., ENS Lyon, 2005.
- (87) Waibel, M., ENS Lyon, 2008.
- (88) Waibel, M.; Hasserodt, J. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6119.
- (89) Rittle, K. E.; Homnick, C. F.; Ponticello, G. S.; Evans, B. E. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47*, 3016.
- (90) Lubell, W. D.; Rapoport, H. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 7447.
- (91) Dinh, T. Q.; Armstrong, R. W. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60*, 8118.
- (92) Grzyb, J. A.; Shen, M.; Yoshina-Ishii, C.; Chi, W.; Brown, R. S.; Batey, R. A. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7153.
- (93) Jung, M. E.; Andrus, W. A.; Ornstein, P. L. *Tetrahedron Letters* **1977**, *18*, 4175.
- (94) Perdicchia, D.; Licandro, E.; Maiorana, S.; Baldoli, C.; Giannini, C. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7733.
- (95) Carmeli, M.; Shefer, N.; Rozen, S. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 8969.
- (96) Vidal, J.; Guy, L.; Sterin, S.; Collet, A. *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 4791.
- (97) Saha, A. K.; Rapoport, H.; Schultz, P. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 4856.
- (98) Wan, P.; Muralidharan, S. *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 4336.
- (99) Kwon, S.; Myers, A. G. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 16796.
- (100) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Nature* **2001**, *409*, 232.
- (101) Angyal, S. In *Glycoscience*; Stütz, A., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: 2001; Vol. 215, p 1.
- (102) Hayashi, M.; Yoshiga, T.; Nakatani, K.; Ono, K.; Oguni, N. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2821.
- (103) Plietker, B. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68*, 7123.
- (104) Bonini, C.; Chiummiento, L.; Funicello, M.; Lupattelli, P.; Pullez, M. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 80.
- (105) Sato, S.; Takahashi, R.; Sodesawa, T.; Fukuda, H.; Sekine, T.; Tsukuda, E. *Catalysis Communications* **2005**, *6*, 607.
- (106) Utsukihara, T.; Nakamura, H.; Watanabe, M.; Akira Horiuchi, C. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 9359.
- (107) Cohen, T.; Tsuji, T. *The Journal of Organic Chemistry* **1961**, *26*, 1681.
- (108) McCormick, J. P.; Tomasik, W.; Johnson, M. W. *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 607.
- (109) Gros, G., ENS Lyon, 2011.
- (110) Parkes, K. E. B.; Bushnell, D. J.; Crackett, P. H.; Dunsdon, S. J.; Freeman, A. C.; Gunn, M. P.; Hopkins, R. A.; Lambert, R. W.; Martin, J. A. *The Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 3656.
- (111) Wissner, A. *The Journal of Organic Chemistry* **1979**, *44*, 4617.
- (112) Lu, T.-J.; Lin, C.-K. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 1621.
- (113) Page, P. C. B.; Parkes, G. A.; Buckley, B. R.; Wailes, J. S. *Synlett* **2011**, *2011*, 3005.
- (114) Martinez Jaramillo, L., Université Claude Bernard Lyon 1, 2014.
- (115) Hilton, B. J.; Wolkowicz, R. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10940.
- (116) Rajakuberan, C.; Hilton, B.; Wolkowicz, R. In *Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases*; MacKenzie, C. R., Henrich, B., Eds.; Humana Press: 2012; Vol. 903, p 393.

- (117) Wang, G. T.; Matayoshi, E.; Jan Huffaker, H.; Krafft, G. A. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 6493.
- (118) Slee, D. H.; Laslo, K. L.; Elder, J. H.; Ollmann, I. R.; Gustchina, A.; Kervinen, J.; Zdanov, A.; Wlodawer, A.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11867.
- (119) Weiss, J.; Haefeli, W. E. In *International Review of Cell and Molecular Biology*; Kwang, W. J., Ed.; Academic Press: 2010; Vol. Volume 280, p 219.
- (120) Kis, O.; Robillard, K.; Chan, G. N. Y.; Bendayan, R. *Trends in Pharmacological Sciences* **2010**, *31*, 22.
- (121) Coburger, C.; Lage, H.; Molnár, J.; Langner, A.; Hilgeroth, A. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62*, 1704.
- (122) Zhou, T.; Ohkoshi, E.; Shi, Q.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 3219.
- (123) Hu, C.; Xu, D.; Du, W.; Qian, S.; Wang, L.; Lou, J.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y. *Molecular BioSystems* **2010**, *6*, 410.
- (124) Palmeira, A.; Vasconcelos, M. H.; Paiva, A.; Fernandes, M. X.; Pinto, M.; Sousa, E. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83*, 57.
- (125) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 13071.
- (126) Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 3893.
- (127) Deshayes, K.; Broene, R. D.; Chao, I.; Knobler, C. B.; Diederich, F. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 6787.
- (128) Kiupel, B.; Niederalt, C.; Nieger, M.; Grimme, S.; Vögtle, F. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 3031.
- (129) Schmuck, C. *The Journal of Organic Chemistry* **2000**, *65*, 2432.
- (130) Barron, A. E.; Zuckerman, R. N. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3*, 681.
- (131) Galow, T. H.; Ilhan, F.; Cooke, G.; Rotello, V. M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 3595.
- (132) Crisma, M.; Moretto, A.; Toniolo, C.; Kaczmarek, K.; Zabrocki, J. *Macromolecules* **2001**, *34*, 5048.
- (133) Bayrak, C. S.; Erman, B. *Molecular BioSystems* **2012**, *8*, 3010.
- (134) Karplus, P. A. *Protein Science* **1996**, *5*, 1406.
- (135) Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. *Journal of Molecular Biology* **1963**, *7*, 95.
- (136) Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 1994.
- (137) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Karle, I. L.; Powell, D. R.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 6206.
- (138) Jiang, H.; Léger, J.-M.; Dolain, C.; Guionneau, P.; Huc, I. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8365.
- (139) Dado, G. P.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 1054.
- (140) Gardner, R. R.; Liang, G. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1806.
- (141) Prince, R. B.; Saven, J. G.; Wolynes, P. G.; Moore, J. S. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 3114.
- (142) Streicher, W. W.; Makhatadze, G. I. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *128*, 30.

- (143) Privalov, G.; Kavina, V.; Freire, E.; Privalov, P. L. *Analytical Biochemistry* **1995**, 232, 79.
- (144) Guichard, G.; Huc, I. *Chemical Communications* **2011**, 47, 5933.
- (145) Scott Lokey, R.; Iverson, B. L. *Nature* **1995**, 375, 303.
- (146) Bassani, D. M.; Lehn, J.-M.; Baum, G.; Fenske, D. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1997**, 36, 1845.
- (147) Vasudev, P. G.; Chatterjee, S.; Shamala, N.; Balaram, P. *Chemical Reviews* **2010**, 111, 657.
- (148) Choi, S.; Isaacs, A.; Clements, D.; Liu, D.; Kim, H.; Scott, R. W.; Winkler, J. D.; DeGrado, W. F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 6968.
- (149) Andrews, M. J. I.; Tabor, A. B. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11711.
- (150) Jackson, D. Y.; King, D. S.; Chmielewski, J.; Singh, S.; Schultz, P. G. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 9391.
- (151) Phelan, J. C.; Skelton, N. J.; Braisted, A. C.; McDowell, R. S. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, 119, 455.
- (152) Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 5891.
- (153) Kelso, M. J.; Hoang, H. N.; Appleton, T. G.; Fairlie, D. P. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 10488.
- (154) Hart, S. A.; Bahadoor, A. B. F.; Matthews, E. E.; Qiu, X. J.; Schepartz, A. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 4022.
- (155) Raguse, T. L.; Lai, J. R.; Gellman, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 5592.
- (156) Barbe, R., ENS Lyon, 2006.
- (157) Barbe, R.; Hasserodt, J. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2199.
- (158) Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, 3849.
- (159) Gordon, D. W.; Steele, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 47.
- (160) Green, J. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, 4287.
- (161) Devraj, R.; Cushman, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, 9368.
- (162) Fuhrhop, J. H.; Penzlin, G. *Organic synthesis: concepts, methods, starting materials*; VCH, 1994.
- (163) Cabrera, G.; Fiaschi, R.; Napolitano, E. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 5867.
- (164) Zhang, D.; Chen, L.; Chen, J.; Liang, Y.; Zhou, H. *Synthetic Communications* **2005**, 35, 2609.
- (165) Pfaltz, A.; Anwar, S. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25, 2977.
- (166) Kurumaya, K.; Okazaki, T.; Seido, N.; Akasaka, Y.; Kawajiri, Y.; Kajiwarra, M.; Kondo, M. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1989**, 27, 217.
- (167) Tang, Q.; Sen, S. E. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 2249.
- (168) Erkkilä, A.; Pihko, P. M. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 2538.
- (169) Erkkilä, A.; Pihko, P. M. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 2007, 4205.
- (170) Sander, M.; Dehmlow, Eckehard V. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, 2001, 399.
- (171) Gutman, A. L.; Zuobi, K.; Bravdo, T. *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 3546.
- (172) Lee, O.-Y.; Law, K.-L.; Ho, C.-Y.; Yang, D. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, 8829.



- (173) Rush, J.; Bertozzi, C. R. *Organic Letters* **2005**, 8, 131.
- (174) Bernhardt, P. V.; Lawrance, G. A. *Coordination Chemistry Reviews* **1990**, 104, 297.
- (175) Wainwright, K. P. *Coordination Chemistry Reviews* **1997**, 166, 35.
- (176) Notni, J.; Šimeček, J.; Wester, H.-J. *ChemMedChem* **2014**, 9, 1107.
- (177) Touti, F.; Maurin, P.; Hasserodt, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52, 4654.
- (178) Schoenfeldt, N. J.; Ni, Z.; Korinda, A. W.; Meyer, R. J.; Notestein, J. M. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, 18684.
- (179) Richman, J. E.; Atkins, T. J. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96, 2268.
- (180) Raßhofer, W.; Vögtle, F. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1977**, 1977, 1340.
- (181) Hoyer, R. C.; Richman, J. E.; Dantas, G. A.; Lightbourne, M. F.; Shinneman, L. S. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 2722.
- (182) Wieghardt, K.; Schmidt, W.; Nuber, B.; Weiss, J. *Chemische Berichte* **1979**, 112, 2220.
- (183) Desogere, P., Université de Bourgogne, 2012.
- (184) Denat, F.; Rousselin, Y.; Desogere, P.; Boschetti, F.; Bernhard, C. France, 2012; Vol. FR2998298.
- (185) McLachlan, G. A.; Fallon, G. D.; Martin, R. L.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Spiccia, L. *Inorganic Chemistry* **1994**, 33, 4663.
- (186) Weisman, G. R.; Vachon, D. J.; Johnson, V. B.; Gronbeck, D. A. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1987**, 886.
- (187) Sobieściak, T. D.; Zielenkiewicz, P. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 2069.
- (188) Roger, M.; Patinec, V.; Bourgeois, M.; Tripier, R.; Triki, S.; Handel, H. *Tetrahedron* **2012**, 68, 5637.
- (189) Sessler, J. L.; Sibert, J. W.; Lynch, V. *Inorganic Chemistry* **1990**, 29, 4143.
- (190) Kovacs, Z.; Sherry, A. D. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, 9269.
- (191) Van Westrenen, J.; Sherry, A. D. *Bioconjugate Chemistry* **1992**, 3, 524.
- (192) Butler, S. J.; McMahon, B. K.; Pal, R.; Parker, D.; Walton, J. W. *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19, 9511.
- (193) Craig, A. S.; Helps, I. M.; Jankowski, K. J.; Parker, D.; Beeley, N. R. A.; Boyce, B. A.; Eaton, M. A. W.; Millican, A. T.; Millar, K.; Phipps, A.; Rhind, S. K.; Harrison, A.; Walker, C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1989**, 794.
- (194) Scheuermann, J. E. W.; Sibbons, K. F.; Benoit, D. M.; Motevalli, M.; Watkinson, M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2004**, 2, 2664.
- (195) Argouarch, G.; Gibson, C. L.; Stones, G.; Sherrington, D. C. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 3795.
- (196) Stones, G.; Argouarch, G.; Kennedy, A. R.; Sherrington, D. C.; Gibson, C. L. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, 2357.
- (197) Koek, J. H.; Kohlen, E. W. J. M. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 3673.
- (198) Galaup, C.; Couchet, J.-M.; Bedel, S.; Tisnès, P.; Picard, C. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 2274.
- (199) Xue-Ting, L.; Yong-Shu, X.; Qing-Liang, L. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry* **2005**, 35, 459.
- (200) Singha, S.; Parida, K. M. *Catalysis Science & Technology* **2011**, 1, 1496.
- (201) Thompson, D. K.; Hubert, C. N.; Wightman, R. H. *Tetrahedron* **1993**, 49, 3827.

## Publications

Dans l'ordre de publication:

1. « Modular construction of quaternary hemiaminal-based inhibitor candidates and their in cellulo assessment with HIV-1 protease » **Guillaume Gros**, Lorena Martinez, Anna Servat Gimenez, Paula Adler, Philippe Maurin, Roland Wolkowicz, Pierre Falson, Jens Hasserodt. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2013**, 21 (17), 5407-5413.
2. « Nouveau procédé de préparation de 1,4,7-triazacyclonone (I) dissymétriques et intermédiaires de synthèse associés » **Guillaume Gros**, Jens Hasserodt. Brevet n° FR1451135.
3. « Coupling of an advanced tri-functionnal building block by reductive amination leads to a protected backbone of a new type of foldamer » **Guillaume Gros**, Emma Fowler, Jens Hasserodt. *Tetrahedron* **2014**, 70, 6554-6560.
4. « Multigram four-step synthesis of 1,4,7-triazacyclononanes with 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub> N-substitution pattern by starting from diethylenetriamine » **Guillaume Gros**, Jens Hasserodt. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 1, 183-187.

## Résumé

Cette thèse décrit le développement d'une gamme d'inhibiteurs de la protéase du VIH-1 et d'un oligomère bio-mimétique comportant en leur sein une ou plusieurs interactions réversibles entre une amine tertiaire et un carbonyle, appelée interaction NCO. Cette interaction est favorisée en milieu fortement protique polaire comme les milieux aqueux.

Ces travaux ont permis de mettre au point une synthèse modulaire qui a donné lieu à l'obtention de 7 nouveaux candidats à l'inhibition de la protéase du VIH-1. Les modifications de synthèse ont notamment permis de travailler à de plus grandes échelles et d'apporter une grande versatilité à cette synthèse. Les candidats obtenus ont alors été testés *in vitro* et *in cellulo* avec une nouvelle méthode en collaboration avec Lorena Martinez et Pierre Falson, de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP).

Dans un deuxième temps, nous avons élaboré une nouvelle stratégie de synthèse d'un oligomère bio-mimétique. Plusieurs monomères et voies de synthèse ont été explorés et un tétramère a pu être isolé. Malheureusement, certains obstacles, notamment issus de la purification, ont limités les quantités obtenues ce qui n'a pas permis de pousser l'étude comportementale de ces oligomères. Les travaux présentés ici sont ceux de l'optimisation de la synthèse et des perspectives concernant ce sujet.

Enfin ce manuscrit détaille le développement d'un nouveau procédé de synthèse permettant l'obtention de dérivés du 1,4,7-triazacyclononane présentant un motif de N-substitutions 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub>, travail ayant abouti au dépôt d'un brevet.

## Abstract

This thesis relates the research performed on the design and synthesis of a new type of HIV-1 protease inhibitors and a new archetype of a bio-mimetic foldamer based on an unusual interaction, the NCO interaction. This interaction occurs between a tertiary amine and a carbonyl group in highly polar and protic media, such as aqueous media.

The first half of my work focused on the development of a modular synthesis towards candidates for the inhibition of HIV-1 protease. This research enabled us to work on large scale and to be able to modify at will most of the candidates' functions. Seven new inhibitors were isolated and tested *in vitro* and *in cellulo* with an original method, in collaboration with Lorena Martinez and Pierre Falson, from the Institute of Biology and Chemistry of Proteins (IBCP).

The second half of my work was dedicated to the design of a new backbone for a bio-mimetic oligomer. A few strategies were explored and a monomer was chosen to be oligomerized. The coupling enabled the isolation of a tetramer. Unfortunately, serious purification issues limited the quantity of the previous tetramer and no foldamer study could be performed. The work presented here are the synthesis' optimization and the perspectives to overcome the purification issues.

In addition, a new process for the synthesis 1,4,7-triazacyclononanes displaying a 2R<sub>a</sub>/R<sub>b</sub> N-substitution pattern was developed from diethylenetriamine in only four steps. This work was patented during this PhD